

**Identifizierung und Charakterisierung des
Bacitracin Biosynthese-Operons aus
Bacillus licheniformis ATCC 10716**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Dirk Konz

aus
Osterode am Harz

Marburg / Lahn 1998

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 24. Juni 98 angenommen

Erstgutachter : Prof. Dr. M. A. Marahiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Tag der mündlichen Prüfung am 22. Juli 1998

Zusammenfassung

Bei der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese dienen multifunktionelle Peptidsynthetasen (PPS) als Matrize für das zu synthetisierende Peptid. Sie erkennen, aktivieren und binden spezifische Substrataminosäuren, die dann gerichtet zum fertigen Produkt verknüpft werden. Die Analyse der Primärstruktur dieser multifunktionellen Enzyme lieferte Informationen über deren geordneten Aufbau aus funktionellen Domänen. Diese Domänen repräsentieren die katalytischen Kerneinheiten der PPS. Ihre Anzahl und Abfolge innerhalb dieser Enzyme bestimmt die Sequenz und Struktur des gebildeten Produktpeptides.

Das von *B. licheniformis* produzierte Dodecylpeptid-Antibiotikum Bacitracin gehört zu der Gruppe der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide. Seine Biosynthese erfolgt an einem multifunktionellen Enzymkomplex, der sich aus den drei Bacitracin-Synthetasen BA1-3 zusammensetzt. Mit Hilfe einer für PPS-Domänen spezifischen PCR-Methode wurden die Gene (*bacA-C*, 43 kb) dieser Enzyme identifiziert und in der Folge kloniert sowie sequenziert. Die Domänenstruktur der abgeleiteten Proteine spiegelt perfekt die strukturellen Eigenschaften von Bacitracin wider und korreliert ebenfalls ideal mit den biochemischen Merkmalen der Bacitracin-Synthetasen BA1-3. Durch die intensive Sequenzanalyse der abgeleiteten BA1-Primärsequenz konnte erstmals ein neuartiger PPS-Domänentyp identifiziert werden, der den Einbau eines Thiazolinringes in das Produkt katalysiert.

Zur Verifizierung der Sequenzdaten wurden ausgewählte Domänenfragmente gezielt amplifiziert, expremiert und biochemisch charakterisiert. Hierdurch konnten eindeutig die postulierten Substratspezifitäten und die typische Kolinearität der Domänen mit der Primärsequenz des Produktes bestätigt werden.

Neben Bacitracin produzieren einige *B. licheniformis* Stämme auch das zyklische Lipoheptapeptid Lichenysin, dessen Biosynthese ebenfalls nicht-ribosomal erfolgt. Mit Hilfe der für PPS-Domänen spezifischen PCR-Methode gelang es weiterhin, ein putatives Lichenysin Biosynthese-Operon (*licA-C*, 26 kb) zu identifizieren. Dieses Operon wurde kloniert sowie molekulargenetisch charakterisiert. Durch die Analyse der abgeleiteten Domänenstruktur, ließ sich auch hier eine perfekte Übereinstimmung mit den strukturellen Eigenschaften der zu erwartenden Produkte nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit zwei komplette Antibiotika-Biosynthese-Operons aus *B. licheniformis* identifiziert, kloniert und auf molekularer Ebene analysiert. Hierdurch konnten insgesamt 19 PPS-Module und ein neuartiger PPS-Domänentyp (Thiazolinringbildung) charakterisiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGEN.....	1
2	EINLEITUNG.....	6
2.1	Sekundärmetabolite und Antibiotika.....	6
2.2	Peptid-Antibiotika.....	7
2.3	Nicht-ribosomale Peptidsynthese.....	12
2.4	Peptidsynthetasen-kodierende Gene.....	13
2.5	Weitere mit PPS-Systemen assoziierte Gene.....	14
2.6	Domänenstruktur von Peptidsynthetase-Modulen.....	16
2.6.1	Die Adenylierungs-A-Domäne.....	17
2.6.2	Die Thiolierungs-T-Domäne und ihre posttranslationale Modifikation.....	18
2.6.3	Die Kondensations-C-Domäne.....	19
2.6.4	Die Thioesterase-Te-Domäne.....	21
2.6.5	Die Epimerisierungs-E-Domäne.....	21
2.6.6	Die N-Methylierungs-M-Domäne.....	22
2.7	Das Peptid-Antibiotikum Bacitracin.....	22
2.8	Lichensine – Lipopeptide aus <i>B. licheniformis</i>	24
2.9	Aufgabenstellung.....	26
3	MATERIAL.....	27
3.1	Geräte.....	27
3.2	Enzyme und Chemikalien.....	28
3.3	Mikroorganismen.....	29
3.4	Vektoren.....	30
	pBluescript II SK –.....	30
3.4.2	pCR-Script SK +.....	31
3.4.3	pQE60 und pQE70.....	31
3.4.4	pREP4.....	32

3.5	Medien	33
4	METHODEN	35
4.1	DNA-Präparation	35
4.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Bacillus</i>	36
4.1.3	Präparation chromosomaler DNA aus <i>B. licheniformis</i>	36
4.1.4	Präparation von λ -Phagen-DNA	37
4.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	39
4.2	Polymerase-Kettenreaktion	39
4.2.1	Phosphorylieren von DNA-Fragmenten	40
4.2.2	Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen	41
4.2.3	Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR-Script-Vektor	41
4.3	Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
4.4	Glätten von überstehenden DNA-Enden	42
4.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	43
4.6	Agarosegelelektrophorese	43
4.6.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese	44
4.6.2	Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	46
4.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	47
4.8.1	CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> Zellen	47
4.8.2	RbCl-kompetente <i>E. coli</i> Zellen	47
4.8.3	Elektrokompetente <i>E. coli</i> Zellen	47
4.9	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	48
4.9.1	Transformation CaCl ₂ und RbCl kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	48
4.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	48
4.10	Herstellung und Transformation kompetenter <i>B. subtilis</i> Zellen	48
4.11	Markierung von DNA-Fragmenten	49
4.11.1	Radioaktive Markierung	50
4.11.2	Markierung mit Fluorescein	50
4.12	Southern-Transfer (<i>Southern-Blot</i>)	50
4.13	Southern-Hybridisierung	51
4.13.1	Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden	51
4.13.2	Verwendung Fluorescein markierten DNA-Sonden	52

4.14	Konstruktion einer λ-EMBL3 Genbank	53
4.14.1	Partielle hydrolytische Spaltung chromosomaler DNA	54
4.14.2	DNA-Größenfraktionierung	55
4.14.3	Ligation mit λ -EMBL 3-Armen	55
4.14.4	Verpackung in λ -Phagenköpfe	55
4.14.5	Präparation von <i>E. coli</i> MgSO ₄ -Zellen für die λ -Phageninfektion	56
4.14.6	Titration der Genbank	56
4.14.7	Plauefilterhybridisierung – Screening der Genbank	56
4.14.8	Vereinzelung positiver λ -Phagen	57
4.14.9	Amplifikation positiver Phagen	57
4.15	DNA-Sequenzierung	57
4.15.1	DNA-Sequenzierung mit radioaktiver Markierung	57
4.15.2	DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-Markierung	60
4.16	Genexpression im pQE-Vektorsystem	61
4.17	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	61
4.17.1	Präparation von Vollzellextrakten für die SDS-PAGE-Analyse	62
4.17.2	Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen	63
4.18	Präparation von Zell-Rohextrakten	63
4.19	IMAC an Ni²⁺-beladenen Chelatsäulen (FPLC)	63
4.20	Entsalzen von Proteinlösungen (Dialyse)	64
4.21	Bestimmung der Proteinkonzentration	64
4.21.1	Proteinbestimmung nach Bradford	64
4.21.2	Proteinbestimmung nach Gill und von Hippel	64
4.22	Ankonzentrierung von Proteinproben	65
4.23	ATP-PP_i-Austauschreaktion mit PPS-Modulen	66
4.24	<i>in vitro</i> Modifikation von PPS-Modulen mit 4'-PAN	66
4.25	Beladung von PPS-Modulen mit radioaktiv markierten Aminosäuren	67
4.26	Produktanalyse von Reaktionen mit BacA1-2	67
4.26.1	Oxidative Thioesterspaltung	68
4.26.2	Alkalische Thioesterspaltung	68
4.26.3	Butanol-Extraktion	68
4.26.4	DC-Analyse	69
4.26.5	<i>Reversed Phase</i> HPLC-Analyse	69
4.27	Nachweis von Surfactin auf Blutagarplatten	69

5	ERGEBNISSE	71
5.1	Identifizierung von PPS-Genfragmenten aus <i>B. licheniformis</i> ATCC 10716	71
5.2	Konstruktion einer Lambda EMBL III Genbank chromosomaler DNA aus <i>B. licheniformis</i>	72
5.3	Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons	73
5.3.1	Klonierung und Sequenzierung des Bacitracin-Biosynthese-Operons	73
5.3.2	Sequenzanalyse des <i>bac</i> -Operons	76
5.3.3	Identifizierung eines neuen PPS-Domänentyps: Die Zyklisierungs-Z-Domäne	77
5.3.4	Biochemische Charakterisierung von BacA-Modulen	81
5.4	Charakterisierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons	96
5.4.1	Klonierung und Sequenzierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons	96
5.4.2	Sequenzanalyse des <i>lic</i> -Operons	98
5.4.3	Analyse der Lichenysin-Produktion	101
5.5	Bli – eine 4'-PAN-Transferase aus <i>B. licheniformis</i>	101
5.5.1	Amplifikation und Klonierung des <i>bli</i> -Gens aus <i>B. licheniformis</i> ATCC 10716	101
5.5.2	Expression und Reinigung von Bli	102
5.5.3	Modifikation von BacA-Modulproteinen durch Bli	104
5.5.4	<i>In vivo</i> Komplementation von <i>sfp</i> durch <i>bli</i> in <i>B. subtilis</i> JH642	104
6	DISKUSSION	106
6.1	Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons	106
6.1.1	Identifizierung des <i>bac</i> -Operons	106
6.1.2	Domänenorganisation des <i>bac</i> -Operons	107
6.2	Biochemische Charakterisierung von BacA-Modulproteinen	111
6.2.1	Adenylierung	111
6.2.2	Posttranslationale Modifikation mit 4'-PAN und Thiolierung	111
6.2.3	Analyse der von BacA1-2 gebildeten Produkte	113
6.3	Identifizierung und Charakterisierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons	114
6.4	Die 4'-PAN-Transferase Bli	115
7	ANHANG	116
7.1	Domänenstruktur sequenzierter PPS-Gene und Struktur der synthetisierten Produkte	116
7.2	Sequenz der über PCR amplifizierten Fragmente PCR01 und PCR05	123
7.3	Sequenzen der <i>bli</i> -Gene aus <i>B. licheniformis</i>	124
8	LITERATURVERZEICHNIS	126

1 Abkürzungen

A	Adenin oder Ampere
Aad	δ -(L- α -Aminoadipinsäure)
ACP	Acyl-carrier-Protein
ACV	δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin
Aeo	2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodekansäure
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp ⁿ	Ampicillin (n $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Endkonzentration)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	Stammsammlung (<i>American type culture collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BA1 (2,3)	Bacitracin-Synthetase 1 (2,3)
β -HDA	β -Hydroxydekansäure
β -ME	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
CIP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestine phosphatase</i>)
Cm ⁿ	Chloramphenicol (n $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration)
CoA	Coenzym A (<i>coenzyme A</i>)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat

dGTP	2' -Desoxyguanosin-5' -triphosphat
DHIV	D-2-Hydroxyisovaleriansäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i><u>d</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dpm	Zerfälle pro Minute (<i><u>d</u>isintegrations per <u>m</u>inute</i>)
ds	Doppelstrang (<i><u>d</u>ouble <u>s</u>trand</i>)
DTE	1,4-Dithioerythrol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2' -Desoxythymidin-5' -triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FL-dUTP	Fluorescein-11-dUTP
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie (<i><u>f</u>ast <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5' -triphosphat
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde(n)
HM	PAGE-Größenstandard (<i><u>h</u>igh molecular weight <u>m</u>arker</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i><u>h</u>igh <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan ⁿ	Kanamycin (n µg/mL Endkonzentration)
kb	Kilobasenpaare
<i>K_d</i>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	molar (mol·L ⁻¹)
m	Meter oder <i>milli</i> (10 ⁻³) in Verbindung m. weiteren Maßeinheiten

μ	<i>micro</i> (10 ⁻⁶)
MCS	multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MeBmt	(4R)-4-[(E)-2-Butenyl]-4-methyl-L-threonin
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	<i>nano</i> (10 ⁻⁹)
NTA	Nitrilotriacetat
OAc	Acetat
OD _v	optische Dichte bei v (nm)
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p	<i>pico</i> (10 ⁻¹²)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
4' -PAN	4' -Phosphopantethein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pfu	Konzentrationseinheit für Phagenlysate (<i>plaque forming unit</i>)
<i>P_n</i>	<i>n</i> -Promotor
PP _i	anorganisches Pyrophosphat (<i>inorganic pyrophosphate</i>)
PPS	Peptidsynthetase(n)
RBS	ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
Sar	Sarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ss	Einzelstrang (<i>single strand</i>)
T	Thymin

TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglykolether) ₁₀
TTP	Tymin-5' -triphosphat
U	Umdrehungen oder Enzymeinheit (<i>unit</i>)
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp
X-Gal	5' -Brom-4-chlor-3-indolylβ-D-galaktosid

Tabelle 1-1 Aminosäuren: Abkürzungen und Molekulargewichte

Aminosäure	3- Buchstabenkode	1-	MW [g·mol ⁻¹]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Asparaginsäure	Asp	D	133
Asn oder Asp	Asx	B	-
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutaminsäure	Glu	E	147
Gln oder Glu	Glx	Z	-
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Ornithin	Orn	O	132
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

2 Einleitung

2.1 Sekundärmetabolite und Antibiotika

Im Stoffwechsel von Organismen unterscheidet man zwischen sekundären und primären Metaboliten. Als Primärmetabolite werden hierbei Verbindungen bezeichnet, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen einer Zelle sind. Zu dieser Gruppe gehören z. B. Aminosäuren, Nukleotide, Kohlenhydrate und Fettsäuren. Im Gegensatz dazu besitzen die Sekundärmetabolite keine lebensnotwendigen Funktionen und werden häufig nur in geringen Mengen sowie in bestimmten Entwicklungsphasen synthetisiert. Zu den sekundären Metaboliten zählen z. B. Pigmente, Geruchsstoffe, Enzyminhibitoren, Toxine und Antibiotika. Heutzutage zählen die bioaktiven sekundären Metabolite aus Mikroorganismen und Pflanzen, wie auch deren synthetische Derivate, zu den am häufigsten verwendeten Therapeutika in der Human- und Veterinärmedizin. Die Einführung der antibiotischen Therapie hat in großem Maße dazu beigetragen, epidemische Infektionskrankheiten zu kontrollieren oder gar gänzlich zurückzudrängen, wodurch eine erhebliche Steigerung der allgemeinen humanen Lebenserwartung erreicht werden konnte. Darüber hinaus gewinnen neue Anwendungen von bioaktiven, biotechnischen Produkten wie z. B. der Einsatz als Immunsuppressiva und Cytostatika in der Medizin oder als tierische Wachstums promotoren und Pestizide in der Agrarindustrie zunehmend an Bedeutung, so daß die intensive Analyse von sekundären Metaboliten in der heutigen biotechnologischen Forschung eine Schlüsselrolle einnimmt [Vinnig *et al.*, 1995; Strohl, 1997; von Döhren *et al.*, 1997].

Eine große Anzahl wirtschaftlich wichtiger, mikrobieller Antibiotika konnte aus Streptomyceten, Pilzen und *Bacillus spp.* isoliert werden. Diese Substanzen weisen eine außerordentlich große strukturelle Vielfalt auf, so daß üblicherweise eine Klassifizierung der Antibiotika gemäß ihrer chemischen Struktur erfolgt. Hierbei unterscheidet man makrozyklische Lactone (z. B. Macrolide, Polyene, etc.), Chinone (z. B. Tetracycline), N-haltige Heterozyklen (z. B. Nukleosid-A.), O-haltige Heterozyklen (z. B. Polyether-A.), alicyclische (Steroid-A.), aromatische (z. B. Chloramphenicol, Grisofulvin), aliphatische (z. B. Fosfomycine), Kohlenhydrat-(z. B. Aminoglykosid-A.), Aminosäuren- und Peptid-Antibiotika (z. B. β -Lactame) [Strohl, 1997; von Döhren & Kleinkauf, 1997]. So sehr sich diese Substanzen in struktureller Hinsicht unterscheiden, so heterogen sind auch ihre Wirkungsmechanismen in den sensitiven Zielorganismen. Die wichtigsten Angriffsorte in der Zelle sind die Zellwand-Biosynthese (Penicilline, Cephalosporine, Vancomycin, Cycloserin u.a.), die Cytoplasmamembran (z. B. Polyen- u. Peptid-A.), die Transkription (Rifampicin, Actinomycine u.a.), die Translation (z. B. Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Erythromycin, Lincomycin) und die Replikation (z. B. Novobiocin, Mitomycin) oder der Atmungsstoffwechsel durch Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung (Antimycin, Valinomycin) [Dax, 1997].

Obwohl die Fragestellung nach der Funktion derartiger sekundärer Stoffwechselprodukte für den Metabolismus des produzierenden Organismus im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen und Diskussionen stand, ist man von einer abschließenden Beantwortung

dieser Frage noch weit entfernt. In Tabelle 2-1 sind einige der postulierten Funktionen von Sekundärmetaboliten zusammengestellt.

Tabelle 2-1 Postulierte Funktionen von Sekundärmetaboliten für den produzierenden Organismus [von Döhren & Kleinkauf, 1997]

exogene Funktionen

- Schutz vor konkurrierenden Mikroorganismen
- Schutz vor physikochemischen Umwelteinflüssen (z. B. UV-Licht)
- Aufnahmen von Spurenelementen (z. B. Fe³⁺ durch Siderophore)
- Entgiftung von toxischen Spurenelementen

endogene Funktionen

- Regulationssignale für die Morphogenese und Reifung
 - Entgiftung von toxischen Stoffwechselprodukten
 - Bereitstellung von besonderen Bausteinen der Zellwand
 - Speichersubstanzen, die von anderen Mikroorganismen nicht funktionalisiert werden können
-

2.2 Peptid-Antibiotika

Die Peptid-Antibiotika stellen die dominierende Gruppe der Sekundärmetabolite von *Bacillus* spp. dar. In bezug auf ihre Biosynthese lassen sich hierbei zwei Klassen von Peptid-Antibiotika unterscheiden: a) ribosomal synthetisierte Peptide und b) nicht-ribosomal an Multienzymkomplexen synthetisierte Peptide. In der ersten Klasse liegen die Polypeptide genkodiert vor und werden zumeist intensiv posttranslational modifiziert und prozessiert, bevor sie als aktives Peptid aus der Zelle exportiert werden (vgl. Abbildung 2-1). Wichtige Vertreter dieser Klasse repräsentieren die von Gram-positiven Mikroorganismen produzierten Lantibiotika [Jung, 1991] wie z. B. Epidermin [Allgeier *et al.*, 1985], Nisin [Gross *et al.*, 1971] oder Subtilin [Nishio *et al.*, 1983]. Die Bezeichnung dieser Substanzgruppe leitet sich hierbei von dem Auftreten der seltenen Aminosäuren *meso*-Lanthionin und 3-Methylanthionin ab.

Die zweite Klasse der Peptid-Antibiotika wird nicht-ribosomal an multifunktionellen Enzymkomplexen, den sogenannten Peptidsynthetasen (PPS) synthetisiert (vgl. Kapitel 2.3) [Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997]. Die aus 2 bis 48 Resten bestehenden Peptide [Kleinkauf *et al.*, 1996] weisen eine enorme strukturelle Vielfalt auf, die sich in erster Linie aus der Fähigkeit der PPS erklärt, neben den 20 proteinogenen Aminosäuren auch eine Vielzahl von ungewöhnlichen Resten in die Peptidkette einzubauen. Derzeit sind bereits über 300 verschiedene, derartige Reste identifiziert worden [Kleinkauf *et al.*, 1990b]. Hierzu zählen z. B. Pseudo-, N-methylierte und D-Aminosäuren sowie auch Carboxysäuren oder β -Hydroxysäuren (vgl. Tabelle 2-2). Untereinander sind die einzelnen Reste über Peptidbindungen oder die Bildung von Estern und Lactonen verknüpft. Bei der letztgenannten

Gruppe, den Depsipeptiden (z. B. Enniatin B) werden Aminosäuren und β -Hydroxysäuren alternierend über Peptid- und Esterbindungen miteinander verbunden [von Döhren & Kleinkauf, 1997]. Darüber hinaus treten in der Substanzklasse der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide aber auch Variationen bezüglich der Peptidhauptkette auf. So findet man neben linearen auch zyklische und verzweigt zyklische Peptide, die ferner durch Acylierungen, Glykosilierungen und die Ausbildung von heterozyklischen Strukturmerkmalen modifiziert sein können (vgl. Tabelle 2-3). In Abbildung 2-2 sind die chemischen Strukturen einiger nicht-ribosomal synthetisierter Peptid-Antibiotika aus Gram-positiven Bakterien und filamentösen Pilzen dargestellt.

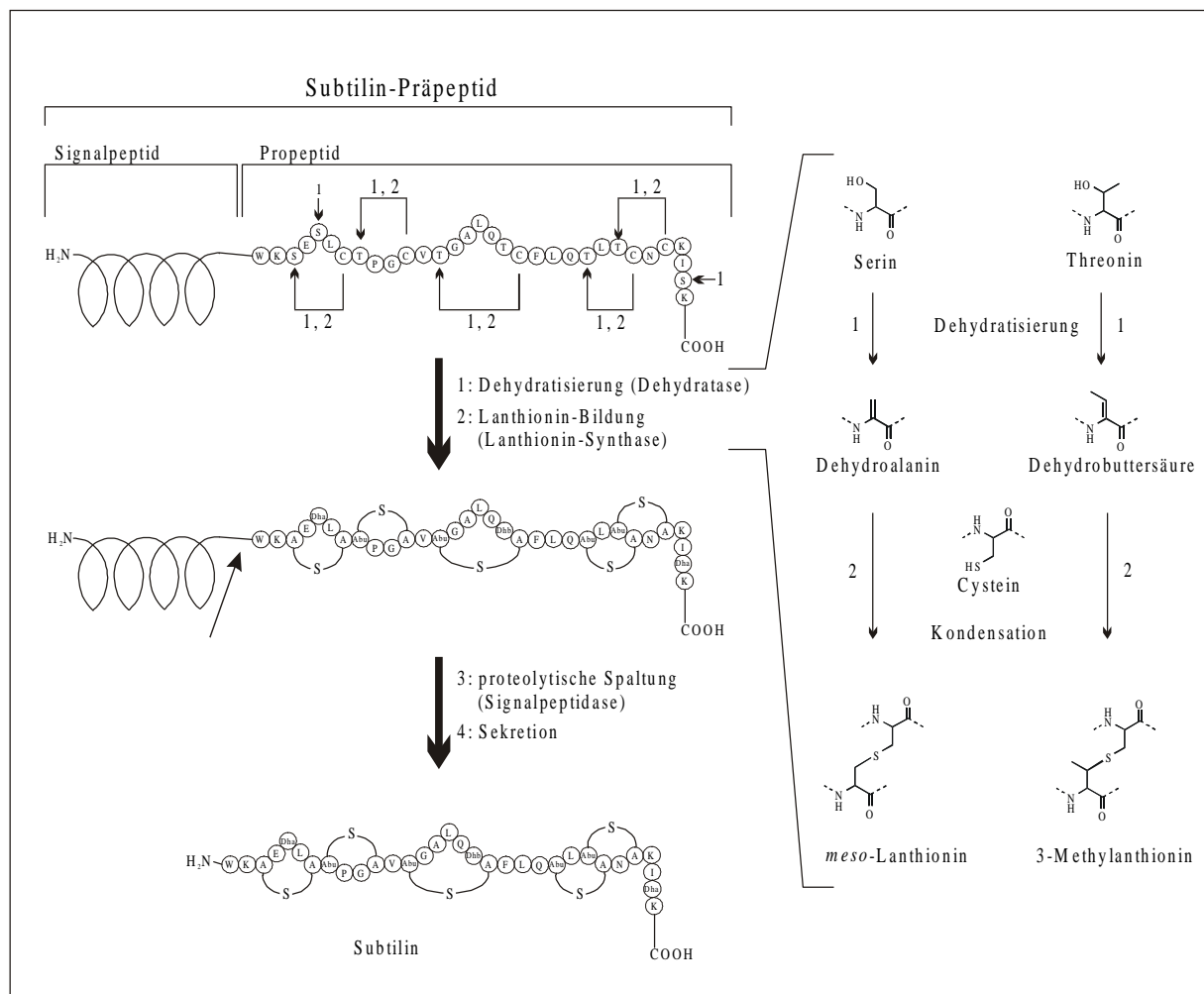


Abbildung 2-1 Modell der Subtilin-Biosynthese [Entian et al., 1993]. Das primäre Translationsprodukt des Subtilin-Strukturgens wird als Prä-Subtilin bezeichnet. Es setzt sich aus der N-terminalen "leader"-Sequenz und dem Pro-Peptid zusammen, aus dem das Lantibiotikum hervorgeht. Die einleitende Modifikationsreaktion ist eine Dehydratisierung von Serin und Threonin (1). Anschließend wird ein Cysteinschwefel addiert (2), nachfolgend die "leader"-Sequenz durch eine Peptidase abgespalten (3) und das Lantibiotikum sekretiert. Abkürzungen: Dha, Dehydroalanin; Dhb, Dehydrobuttersäure; Abu, Aminobutyryn.

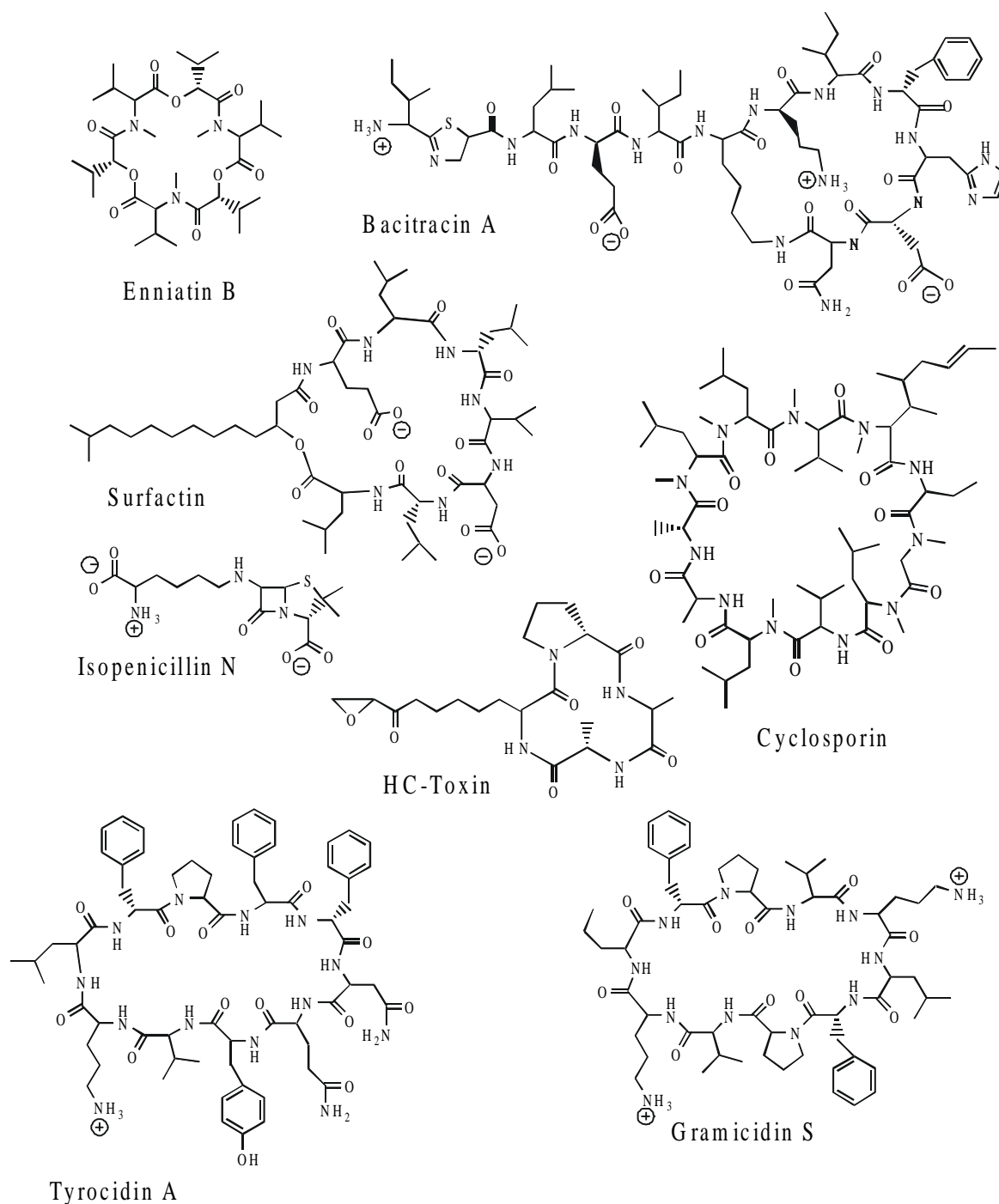


Abbildung 2-2 Chemische Strukturen von Peptid-Antibiotika aus Gram-positiven Bakterien (Gramicidin S, Bacitracin A, Surfactin und Tyrocidin A) und filamentösen Pilzen (HC-Toxin, Enniatin B, Cyclosporin und Isopenicillin N). Aminosäuren in D-Konformation sind durch eine Stereodarstellung gekennzeichnet.

Tabelle 2-2 Beispiele für nicht-proteinogene Reste von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden [Marahiel et al., 1997]

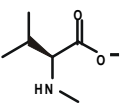
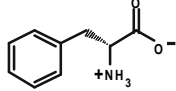
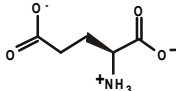
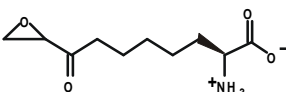
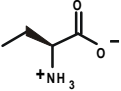
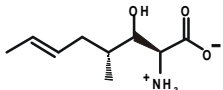
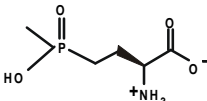
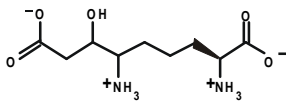
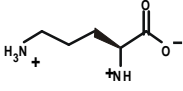
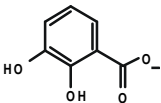
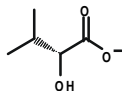
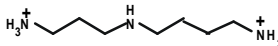
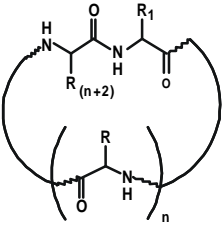
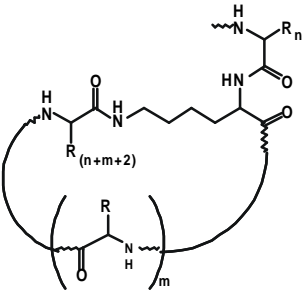
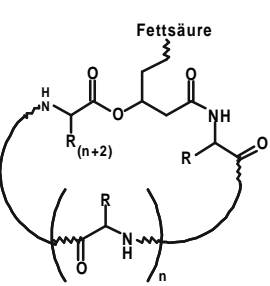
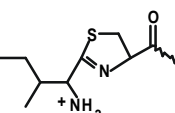
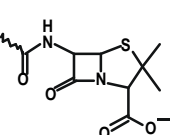
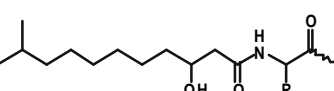
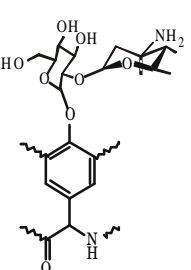
Name	Struktur	Abkürzung	System(e)	Organismus
modifizierte, proteinogene Aminosäuren				
N-Methyl AS (z. B. N-Methyl-L-Valin)		MeVal	Cyclosporin Enniatin	<i>Tolypocladium niveum</i> <i>Fusarium scirpi</i>
D-AS (z.B. D-Phenylalanin)		D-Phe	Bacitracin Gramicidin S Tyrocidin	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus brevis</i>
nicht-proteinogene Aminosäuren				
δ-(L-α-Aminoadipinsäure)		Aad	ACV-Tripeptid (Penicillin)	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodecensäure		Aeo	HC-Toxin	<i>Cochliobolus carbonum</i>
L-α-Aminobuttersäure		Abu	Cyclosporin	<i>Tolypocladium niveum</i>
(4R)-4[(E)-2-Butenyl-4-methyl-L-threonin]		Bmt	Cyclosporin	<i>Tolypocladium niveum</i>
Phosphinotricin		Pt	Bialaphos	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
2,6-diamino-7-hydroxy-Azealinsäure		Dha	Edein	<i>Bacillus brevis</i>
Ornithin		Orn	Bacitracin Gramicidin S Tyrocidin	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus brevis</i>
Carboxysäuren				
2,3-Dihydroxy-Benzoesäure		Dhb	Enterobactin	<i>Escherichia coli</i>
D-α-Hydroxyisovaleriansäure		Hiv	Enniatin	<i>Fusarium scirpi</i>
Amine				
Spermidin		Sperm	Edein	<i>Bacillus brevis</i>

Tabelle 2-3 Strukturelle Variabilität der Peptidhauptkette von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden [Marahiel et al., 1997]

Modifikation	Struktur	System(e)	Organismus
Ringbildung			
Zyklisierung		z.B. Cyclosporin Gramicidin S Tyrocidin	<i>Tolypocladium niveum</i> <i>Bacillus brevis</i>
Verzweigung (Amidbindung)		Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>
Verzweigung (Esterbindung)		Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Thiazolinring-Bildung (zwischen Ile und Cys)		Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>
β -Lactamring-Bildung (zwischen Cys und D-Val)		ACV-Tripeptide (Penicillin)	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Additionen (Fettsäuren und Kohlenhydrate)			
Acylierung		Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Glycosylierung		Vancomycin	<i>Streptomyces orientalis</i>

2.3 Nicht-ribosomale Peptidsynthese

Die Enzyme der nicht-ribosomalen Peptidsynthese, die sogenannten multifunktionellen Peptidsynthetasen (PPS), sind bereits seit Mitte der 60er Jahre Gegenstand intensiver biochemischer Untersuchungen [Tomino *et al.*, 1964; Fujikawa *et al.*, 1968; Frøyskov *et al.*, 1970; Lipmann *et al.*, 1971]. Es konnte gezeigt werden, daß diese Proteine einen modularen Aufbau besitzen. Ein Modul repräsentiert hierbei per Definition eine funktionell selbstständige Einheit, die für die Erkennung, Aktivierung, kovalente Bindung und Inkorporation einer spezifischen Aminosäure in das Produktpeptid verantwortlich ist [Lipmann, 1980]. Da bei der kovalenten Bindung der aktivierten Aminosäuren die Beteiligung eines enzymgebundenen 4'-Phosphopantethein-Kofaktors (4'-PAN) nachgewiesen werden konnte, führten Lipmann *et al.* in Analogie zur Fettsäurebiosynthese den *thiotemplate*-Mechanismus als Model der nicht-ribosomalen Peptidsynthese ein [Lipmann *et al.*, 1971; Laland *et al.*, 1973; Kurahashi, 1974].

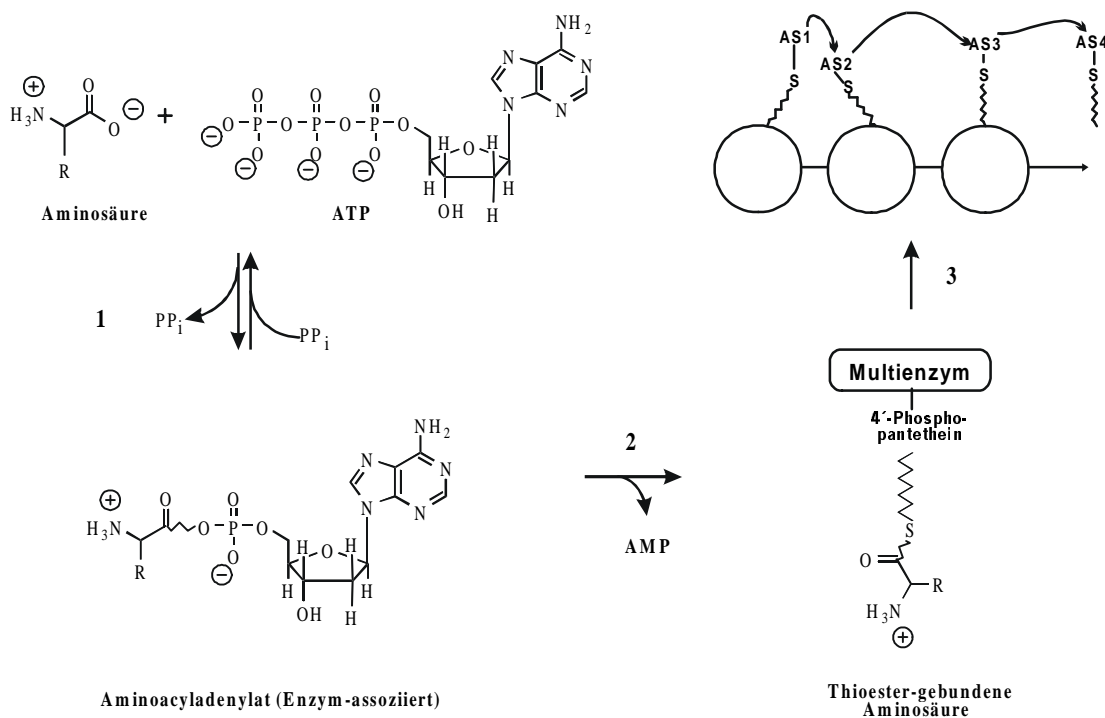


Abbildung 2-3 Model der nicht-ribosomalen Peptidsynthese. Die in das Produktpeptid einzubauenden Aminosäuren werden zunächst als Enzym-assoziiertes Aminoacyladenylat aktiviert (1) und nachfolgend als Thioester kovalent auf 4'-PAN-Kofaktoren geladen (2). In einer geordneten Folge von Transpeptidierungen (3) erfolgt dann entlang der Proteinmatrize ein sukzessives Kettenwachstum bis hin zum fertigen Produktpeptid.

Nach diesem Modell fungieren die Enzyme mit ihrer geordneten Abfolge von Modulen als Matrize für das zu synthetisierende Peptid. Zunächst werden die Aminosäuren als Enzym-assoziiertes Aminoacyladenylat unter gleichzeitiger ATP-Hydrolyse aktiviert. Diese relativ instabilen Intermediate werden nachfolgend durch die Übertragung auf eine Thiolgruppe des Enzyms unter Bildung eines Thioesters stabilisiert [Gevers *et al.*, 1968; Gevers *et al.*, 1969; Schlumbohm *et al.*, 1985; Vater *et al.*, 1985]. Die so aktivierten Aminosäuren können dann über eine Transthiolierung von einem 4'-PAN-Kofaktor, der als zentraler Schwingungsarm fungiert, aufgenommen und zum nachfolgenden Modul weitergereicht werden. In einer geordneten Folge von Transthiolierungen und Transpeptidierungen findet dadurch ein

sukzessives Kettenwachstum bis hin zum fertigen Produktpeptid statt. Neuere biochemische Untersuchungen zeigten jedoch, daß an jedem der PPS-Module ein solcher 4' -PAN-Kofaktor gebunden ist [Gocht *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1995], so daß in einer Erweiterung des ursprünglichen *thiotemplate*-Mechanismus der *multiple carrier thiotemplate*-Mechanismus formuliert wurde (vgl. Abbildung 2-3) [Stein *et al.*, 1996]. Dabei stellen die Kofaktoren die spezifischen Bindungsstellen der aktivierten Aminosäuren dar.

In einige nicht-ribosomal synthetisierte Peptide werden N-methylierte oder D-Aminosäuren in das Produktpeptid eingebaut. Bei der Analyse der korrespondierenden PPS-Module konnte man zeigen, daß zunächst die nicht modifizierten Aminosäuren aktiviert und als Thioester gebunden werden. Erst auf der Stufe dieser Thioester wird dann durch die Enzyme die entsprechende Modifikationsreaktion katalysiert [Vater *et al.*, 1976; Billich *et al.*, 1987; Haese *et al.*, 1994; Pieper *et al.*, 1995; Stachelhaus *et al.*, 1995a; Stein *et al.*, 1995]. Hierbei muß jedoch in Bezug auf die Epimerisierung eine Unterscheidung zwischen N-terminalen und internen bzw. C-terminalen Aminosäuren des Produktpeptides getroffen werden. Im Fall der N-terminalen Aminosäuren findet nämlich tatsächlich eine Epimerisierung der als Thioester gebundenen Aminosäure statt, wohingegen bei den internen und C-terminalen Aminosäuren die Konversion von der L- in die D-Form erst auf der Stufe der als Thioester gebundenen Peptide erfolgt [Schwecke *et al.*, 1992; Stindl *et al.*, 1994; Shiau *et al.*, 1995]. Die Termination der nicht-ribosomalen Peptidsynthese und die Freisetzung des als Thioester gebundenen Produktpeptides erfolgt durch Hydrolyse, Zyklisierung oder Übertragung auf eine funktionelle Gruppe wie z. B. ein Phospholipid [Kleinkauf & von Döhren, 1990b; Kleinkauf & von Döhren, 1996].

2.4 Peptidsynthetasen-kodierende Gene

In den letzten 10 Jahren wurden zahlreiche Gene, die für PPS kodieren, identifiziert, kloniert, charakterisiert und sequenziert (vgl. Kapitel 7.1). In bakteriellen Systemen findet man diese Gene häufig als Operons organisiert, die sich über einen Bereich von 18 bis 45 kb erstrecken können. Beispiele hierfür sind die *grs*-, *srfA*- und *tyc*-Operons aus *Bacillus spp.*, die in die Biosynthese der Peptid-Antibiotika Gramicidin S, Surfactin und Tyrocidin involviert sind [Krättschmar *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992; Cosmina *et al.*, 1993; Mootz *et al.*, 1997b]. Die jeweiligen Gene kodieren hierbei für PPS mit einem (TycA) bis zu sechs Modulen (TycC) [Mootz & Marahiel, 1997b]. Im Gegensatz zu den bakteriellen Systemen findet man bei filamentösen Pilzen eine etwas modifizierte Genorganisation. So werden hier alle, für die Synthese eines Peptides erforderlichen, Module der PPS von einem einzigen, zusammenhängenden Gen kodiert. Als Vertreter dieser Klasse sind die Gene *hts1*, *esyn1*, *cssA* und *acvA* zu erwähnen, deren Translationsprodukte an der Biosynthese von HC-Toxin, Enniatin, Cyclosporin und ACV-Tripeptid, einem Zwischenprodukt der Isopenicillin N-Synthese, beteiligt sind [MacCabe *et al.*, 1991; Scott-Craig *et al.*, 1992; Haese *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1994]. Diese Gene besitzen eine Größe von 10 bis zu 46 kb und kodieren für PPS, die zwei (Esyn1) bis elf Module (CssA) umfassen können (vgl. Abbildung 2-4). Bemerkenswert ist dabei, daß die Cyclosporin-Synthetase CssA das größte bisher identifizierte, aus einer einzigen Polypeptidkette bestehende Protein darstellt [Weber *et al.*, 1994].

Durch die intensive Sequenz- und Struktur-/Funktions-Analyse der identifizierten PPS-Gene wurde der modulare Aufbau dieser Enzymklasse auch auf molekularer Ebene bestätigt

[Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997]. Tatsächlich konnte eine noch stärkere Strukturierung dieser Enzyme in funktionelle Domänen getroffen werden, die die eigentlich katalytischen Baueinheiten der PPS darstellen (vgl. Kapitel 2.6). Als eine Art Minimalmodul läßt sich hierbei ein ca. 650 Aminosäuren großer Bereich eingrenzen, der für die Aktivierung und Thiolierung einer spezifischen Substrataminosäure verantwortlich ist. Dieser Bereich setzt sich aus zwei Domänen - der Adenylierungs-A-Domäne (rot) und der Thiolierungs-T-Domäne (grün) – zusammen. Zwischen zwei derartigen Minimalmodulen findet man Kondensations-C-Domänen (weiß), die die Transpeptidierungsreaktion katalysieren. Bei Modulen, welche für die Inkorporation von N-methylierten bzw. D-Aminosäuren in das Produktpeptid verantwortlich sind, werden die Minimalmodule durch zusätzliche Domänen erweitert. So findet man z. B. in entsprechenden Modulen als Insertion zwischen A- und T-Domäne eine Methylierungs-M-Domäne (oliv) oder C-terminal zur T-Domäne eine Epimerisierungs-E-Domäne (blau). Ein weiterer Domärentyp, die Thioesterase-Te-Domäne (violett), welche Sequenzhomologien zu Thioesterasen aufweist, wird häufig an C-terminalen Lokalisationen von bakteriellen Operons gefunden (vgl. Abbildung 2-4).

2.5 Weitere mit PPS-Systemen assoziierte Gene

Neben den Genen der PPS hat man weitere Gene identifiziert, die in bakteriellen Systemen häufig mit den jeweiligen Biosyntheseoperons assoziiert vorliegen. Einige dieser Gene befinden sich innerhalb der Operons und nehmen 3' - oder 5' -terminale Positionen ein (vgl. Abbildung 2-4) [Krättschmar *et al.*, 1989; Cosmina *et al.*, 1993; Mootz & Marahiel, 1997b]. Ihre Genprodukte zeigen signifikante Homologie zu Fettsäure-Thioesterasen des Typ II und weisen untereinander eine Identität von ca. 30 % auf. Durch Deletionsanalysen am Beispiel des *srfA*-Operons konnte gezeigt werden, daß diese Proteine eine wichtige, wenn auch nicht essentielle, Rolle bei der nicht-ribosomalen Peptidsynthese spielen [Schneider *et al.*, 1998a]. Über die Art ihrer Funktion liegen jedoch noch keine gesicherten Erkenntnisse vor.

Eine weitere Klasse von Genen wie z. B. *sfp* und *gsp* werden häufig in unmittelbarer Nähe zu den PPS-Operons gefunden (vgl. Abbildung 2-4) [Cosmina *et al.*, 1993; Borchert *et al.*, 1994]. Die Produkte dieser Gene spielen eine essentielle Rolle in der nicht-ribosomalen Biosynthese von Peptiden. So führt z. B. die Unterbrechung des ca. 4 kb stromabwärts vom *srfA*-Operon lokalisierten *sfp*-Gens, zu einer totalen Inhibierung der Surfactin-Biosynthese, obwohl die Expression der *srfA*-PPS hierdurch nicht beeinflußt wird [Nakano *et al.*, 1988; Grossman *et al.*, 1993]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Enzyme zur Superfamilie der 4' -PAN-Transferasen gehören und maßgeblich für die posttranslationale Modifikation der PPS mit den 4' -PAN-Kofaktoren verantwortlich sind [Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998].

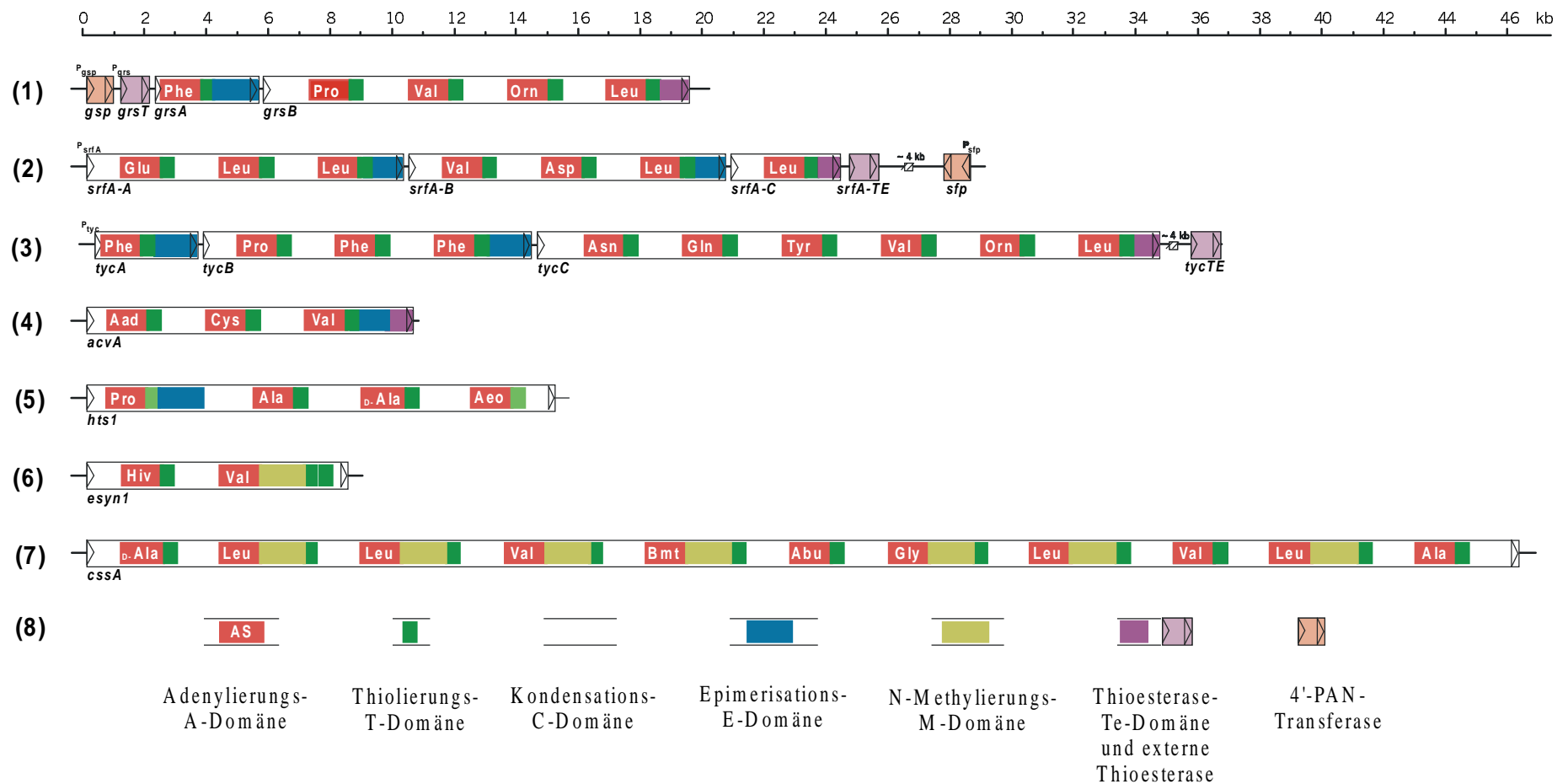
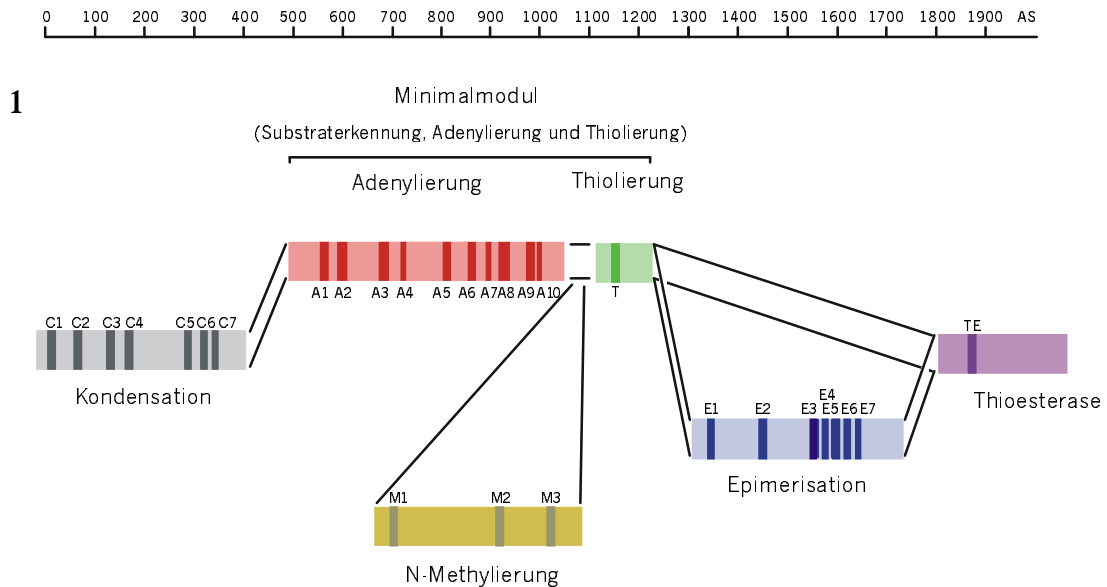


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der abgeleiteten Domänenstruktur von Genen, die für PPS kodieren. Abgebildet sind die bakteriellen Operons von *grs* (1), *srfA* (2), *tyc* (3) und die PPS-Gene aus filamentösen Pilzen *acvA* (4), *hts1* (5), *esyn1* (6) und *cssA* (7). Durch einen Farbkode (8) werden die Abfolge sowie die Lokalisationen der identifizierten Domänen und assoziierten Proteine markiert.

2.6 Domänenstruktur von Peptidsynthetase-Modulen

Im Folgenden sollen nun die in Kapitel 2.4 erwähnten funktionellen Domänen von PPS-Modulen etwas näher beschrieben werden.



2

Domäne	Core #	Consensus Sequenz
Adenylierung	A1	L(TS)YxEL
	A2 (core 1)	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3 (core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6 (core 3)	GELxIxGxG(VL)ARGYL
	A7 (core 4)	Y(RK)TGDL
	A8 (core 5)	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
Thiolierung	T (core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(LI)
Kondensation	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RDxSRNPL
Thioesterase	Te	G(HY)SxG
Epimerisation	E1	PIQxWF
	E2 (His)	HHxISDG(WV)S
	E3 (race A)	DxLLxAxG
	E4 (race B)	EGHGRE
	E5 (race C)	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	E6	PxxGxGYG
	E7 (race D)	FNYLG(QR)
N-Methylierung	M1 (SAM)	VL(DE)GxGxG
	M2	NELSxYRYxAV
	M3	VExSxARQxGxLD

Frühere Nomenklatur ist in Klammern angegeben.

Abbildung 2-5 (1) Aufbau eines PPS-Moduls aus funktionell eigenständigen. Die relativen Positionen der für jeden Domärentyp charakteristischen Core-Motive sind durch dunkle Streifen markiert. (2) Konservierte Core-Motive von PPS-Domänen.

2.6.1 Die Adenylierungs-A-Domäne

Die A-Domänen stellen die katalytischen Kerneinheiten der PPS dar. Durch die Anzahl und Abfolge der A-Domänen innerhalb eines PPS-Systems wird die Primärsequenz des Produktpeptides determiniert (vgl. Abbildung 2-2 und 2-4) [Stachelhaus & Marahiel, 1995a; Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel *et al.*, 1997]. Aus diesem Grund beschäftigten sich auch die meisten Untersuchungen an PPS mit der Analyse von A-Domänen.

Für den durch die Proteinmatrize gesteuerten Einbau einer Aminosäure in das Produkt ist eine zweistufige Aktivierung des Substrates erforderlich (vgl. Abbildung 2-3). Die erste Aktivierung der Substrataminosäure als Enzym-assoziiertes Aminoacyladenylat wird durch die A-Domäne katalysiert. Für die zweite Stufe, die Bindung der aktivierten Aminosäure als Thioester an einen kovalent mit dem Enzym verknüpften 4' -PAN-Kofaktor, ist eine weitere Domäne, die T-Domäne, notwendig (s.u.). Die Art der Aminosäureaktivierung zeigt Homologie zur ribosomalen Peptidsynthese [Lipmann *et al.*, 1971; Lipmann, 1980; Stachelhaus & Marahiel, 1995a; Kleinkauf & von Döhren, 1996]. Auch dort werden die Substrataminosäuren zunächst durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Aminoacyladylate aktiviert. Anschließend erfolgt jedoch im Gegensatz zur nicht-ribosomalen Peptidsynthese eine Übertragung auf die 2' - oder 3' -Hydroxylgruppe der korrespondierenden tRNA unter Ausbildung eines Esters. Obwohl die Reaktionssequenzen beider Systeme sehr ähnlich bzw. analog sind, weisen die involvierten Enzyme weder Homologie bzgl. ihrer Primär- noch ihrer 3D-Struktur auf [Delarue, 1995; Onesti *et al.*, 1995; Conti *et al.*, 1996; Cusack *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 1997].

Die ca. 550 Aminosäuren umfassenden A-Domänen aus PPS weisen auf Sequenzebene eine signifikante Homologie zu Acetyl-CoA-Synthetasen und Luciferasen auf. Da alle diese Enzyme eine ähnliche Reaktion katalysieren, nämlich die Adenylierung ihrer Carboxy-Substrate, bezeichnet man sie heute als die Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme [Turgay *et al.*, 1992]. Innerhalb dieser Enzyme lassen sich durch Sequenzalignments hochkonservierte Bereiche, die sogenannten Core-Motive, identifizieren (vgl. Abbildung 2-5). Diese treten innerhalb dieser Superfamilie mit nahezu unveränderter Lokalisation und Sequenz auf [Turgay *et al.*, 1992; Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel *et al.*, 1997]. Aus diesem Grund hat man bereits früh angenommen, daß die Reste der Core-Motive eine essentielle Rolle bei der Katalyse der Adenylat-Bildung spielen. Durch intensive Mutationsanalysen in verschiedenen Systemen konnte diese Rolle in vielen Fällen verifiziert werden [Tokita *et al.*, 1993; Gocht & Marahiel, 1994; Pavela-Vrancic *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1995]. Neue Einblicke in die funktionelle Bedeutung dieser Reste hat man insbesondere durch die Lösung der Kristallstruktur der Leuchtkefer Luciferase [Baldwin, 1996; Conti *et al.*, 1996] und der GrsA-A-Domäne gewonnen [Conti *et al.*, 1997]. Obwohl beide Enzyme nur 16 % Identität bzgl. ihren Primärsequenz besitzen, weisen sie eine ausgesprochen homologe Faltungstopologie auf. Die Kristallstruktur der GrsA-A-Domäne, welche mit ihren Substraten Phenylalanin und ATP kokristallisiert worden war, bestätigt die essentielle Rolle der Core-Motive in der Reaktionskatalyse. So konnte nämlich die überwiegende Mehrheit der hochkonservierten Bereiche in unmittelbarer, räumlicher Nachbarschaft zu den gebundenen Substraten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2-6). Ausgehend von der hohen Verwandtschaftsbeziehung (30-70 % Identität) der bisher weit über 100 identifizierten PPS-A-Domänen (vgl. Kapitel 7.1) kann postuliert werden, daß die für die GrsA-A-Domäne

identifizierte 3D-Struktur als Prototyp für die gesamte Klasse der PPS-A-Domänen verstanden werden kann [Conti *et al.*, 1997]. Somit könnten sich in naher Zukunft durch die Kombination von *molecular modelling* und gerichteten Mutationen neue, bisher ungeahnte Perspektiven für die gezielte Veränderung der Substraterkennung von A-Domänen eröffnen.

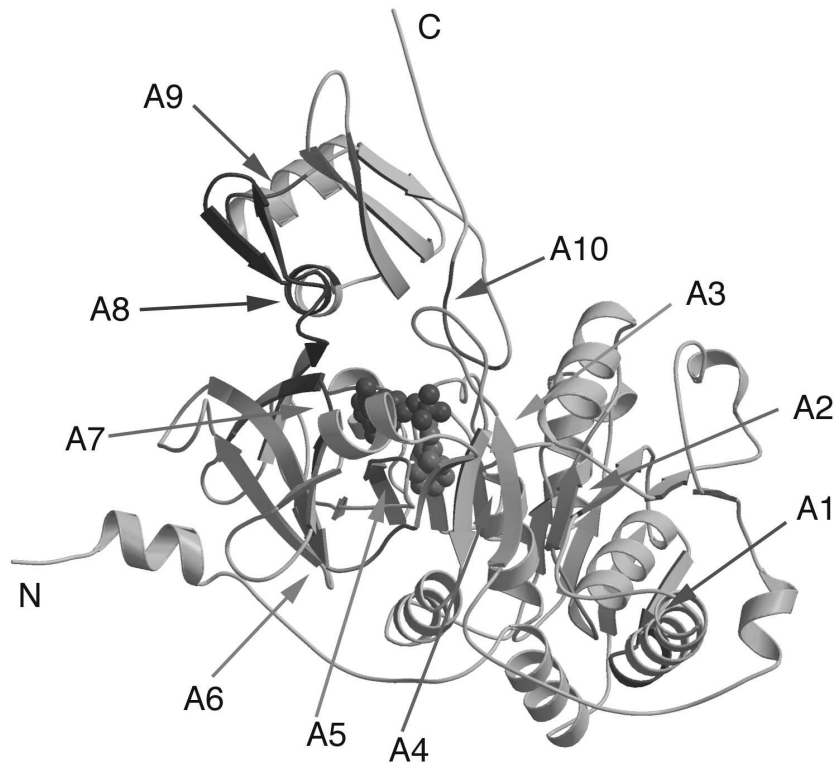


Abbildung 2-6 Kristallstruktur des GrsA-A-Domänenproteins aus *Bacillus brevis*. Die gebundenen Substrate, AMP (rot) und Phenylalanin (orange) sind durch eine raumfüllende Darstellung abgebildet. Die Lokalisation der hochkonservierten Core-Motive (A1-A10) wird durch Pfeile und farbige Markierungen angezeigt [Conti *et al.*, 1997].

Die A-Domänen stellen integrierte Bestandteile der PPS dar, wohingegen die homologen Acetyl-CoA-Synthetasen eigenständige Enzyme sind [Turgay *et al.*, 1992; Baldwin, 1996]. Ausgehend von ersten Untersuchungen an Verkürzungsmutanten von TycA sowie GrsA [Dieckmann *et al.*, 1995; Stachelhaus & Marahiel, 1995a] und schließlich der heterologen Expression von einzelnen A-Domänen-Proteinen in *E. coli* [Konz *et al.*, 1997; Mootz & Marahiel, 1997b; Konz *et al.*, 1998] konnte gezeigt werden, daß auch eigenständige A-Domänen eine den Wildtyp-Proteinen vergleichbare katalytische Aktivität besitzen. Hierdurch wurde einmal mehr die Hypothese bestätigt, daß PPS als eine Kette von funktionell eigenständigen Domänen verstanden werden können, die in einem geordneten Zusammenspiel eine gerichtete Peptidsynthese propagieren [Marahiel, 1997; Mootz *et al.*, 1997a].

2.6.2 Die Thiolierungs-T-Domäne und ihre posttranslationale Modifikation

In der nicht-ribosomalen Peptidsynthese werden die von A-Domänen aktivierten Aminosäuren auf kovalent mit den T-Domänen verknüpfte 4' -PAN-Kofaktoren geladen (vgl. Abbildung 2-3) [Stein *et al.*, 1996]. Diese T-Domänen sind innerhalb der PPS jeweils C-

terminal von einer A-Domäne lokalisiert. Sie sind verwandt zu dem *Acyl-Carrier-Protein* (ACP) aus modularen Fettsäure- oder Polyketid-Synthasen, welches ebenfalls ein integraler Bestandteil dieser Multienzyme ist [Sherman *et al.*, 1989; Fernandez-Moreno *et al.*, 1992; Rawlings *et al.*, 1992; Cheret *et al.*, 1993; Marahiel *et al.*, 1997]. Wie ACP besitzen auch die T-Domänen einen hochkonservierten Sequenzbereich (Core-Motiv T, vgl. Abbildung 2-5) mit einem invarianten Serinrest, dessen Seitenkette mit dem 4' -PAN-Kofaktor modifiziert wird [Stachelhaus *et al.*, 1996a; Stein *et al.*, 1996]. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion, die von der vor kurzem identifizierten Superfamilie der 4' -PAN-Transferasen vermittelt wird [Lambalot *et al.*, 1996]. Diese Proteine katalysieren den nukleophilen Angriff des Serin-Hydroxyl-O-Atoms auf die β -3' -Phosphatgruppe von CoA. Hierdurch wird 4' -PAN kovalent über eine Phosphoesterbindung mit dem Enzym verknüpft und 3' ,5' ADP freigesetzt (vgl. Abbildung 2-7).

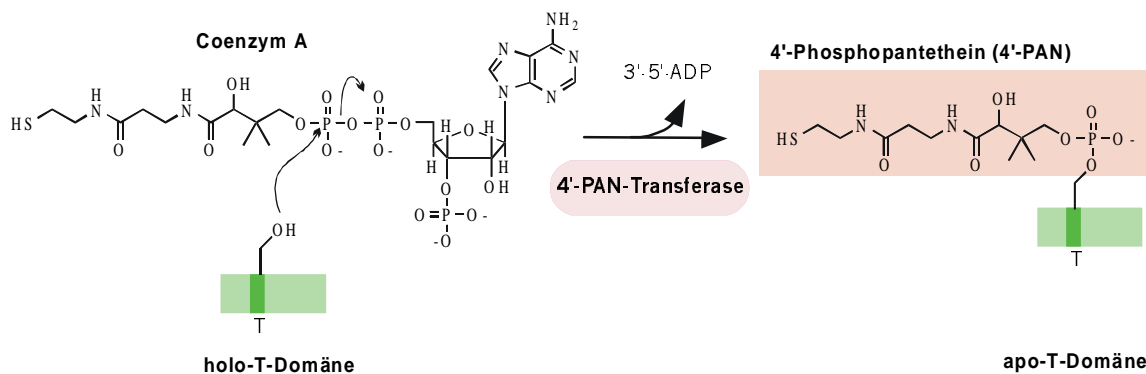


Abbildung 2-7 Modell der posttranslationalen Modifikation von PPS-T-Domänen durch eine 4'-PAN-Transferase.

Auch am Beispiel von T-Domänen ist es inzwischen gelungen, diese als eigenständige Proteine in *E. coli* zu exprimieren, *in vitro* mit 4' -PAN zu modifizieren und sogar durch Inkubation mit A-Domänen in Gegenwart derer Substrataminosäuren sowie ATP kovalent mit einer Aminosäure zu beladen [Stachelhaus *et al.*, 1996a; Dökel *et al.*, 1997]. Somit wurde ebenfalls für diesen Domärentyp seine funktionelle Eigenständigkeit nachgewiesen. In einer konsequenten Fortentwicklung des aus diesen Untersuchungen gewonnenen Bildes von PPS, die aus funktionellen Domänen aufgebaut sind, ist es sogar gelungen, komplette AT-Minimalmodule innerhalb der SrfA-Synthetasen einem gezielten genetischen Austausch zu unterwerfen. Diese neuen Hybridsynthetasen induzierten dann *in vivo* tatsächlich die Synthese, der anhand der vorgenommenen Austausche postulierten, Peptide mit veränderter Primärsequenz [Stachelhaus *et al.*, 1995b; Stachelhaus *et al.*, 1996b; Schneider *et al.*, 1998b].

2.6.3 Die Kondensations-C-Domäne

Die C-Domänen, welche einen Bereich von ca. 450 Aminosäuren umfassen (vgl. Abbildung 2-5), werden in PPS-Systemen zwischen zwei Aminosäure aktivierenden Modulen gefunden (vgl. Abbildung 2-4). Befinden sich diese aufeinander folgenden Module nicht auf einer einzigen Polypeptidkette, so ist die entsprechende C-Domäne am N-Terminus der Aminosäure- bzw. Peptid-aufnehmenden Synthetase lokalisiert [Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel, 1997; Mootz & Marahiel, 1997a]. Aufgrund dieser Positionierung sowie der

Übereinstimmung in der absoluten Anzahl der C-Domänen und der Peptidbindungen des linearen Produktpeptides wurde eine funktionelle Bedeutung dieses Domäentyps für die Elongationsreaktion postuliert [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995].

C-Domänen weisen untereinander eine schwächere Konservierung als die A-Domänen auf. Dennoch besitzen auch sie hochkonservierte Core-Motive, von denen eines (C3, vgl. Abbildung 2-5) auch bei zwei weiteren Enzymklassen angetroffen wird [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995]. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT) und Dihydrolipoyl-Transacetylasen (E2p). Beide Enzymklassen katalysieren den Transfer von Thioester-aktivierten Acetylgruppe. Zum einen wird die Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf eine Hydroxylgruppe von Chloramphenicol übertragen und zum anderen findet ein Transfer einer als Thioester mit Dihydrolipoylamid verknüpften Acetylgruppe auf CoA statt. Diese Reaktionen ähneln in starkem Maße der Übertragung einer als Thioester aktivierten Aminosäure auf die Aminofunktion der nachfolgenden Aminosäure in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Anhand der gelösten Kristallstruktur von CAT und E2p konnte gezeigt werden, daß beide Enzyme eine identische Topologie aufweisen. In beiden Fällen wird angenommen, daß das zweite Histidin des konservierten HHxxDG-Motivs als katalytische Base für den nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-C-Atom des jeweiligen Thioesters fungiert [Leslie, 1990; Mattevi *et al.*, 1992]. Daraus schließt man für PPS, daß das konservierte C3-Motiv in C-Domänen eine ähnliche Funktion besitzen könnte und vermutlich eine wichtige Rolle in der Katalyse der Kondensationsreaktion spielt (vgl. Abbildung 2-8) [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995].

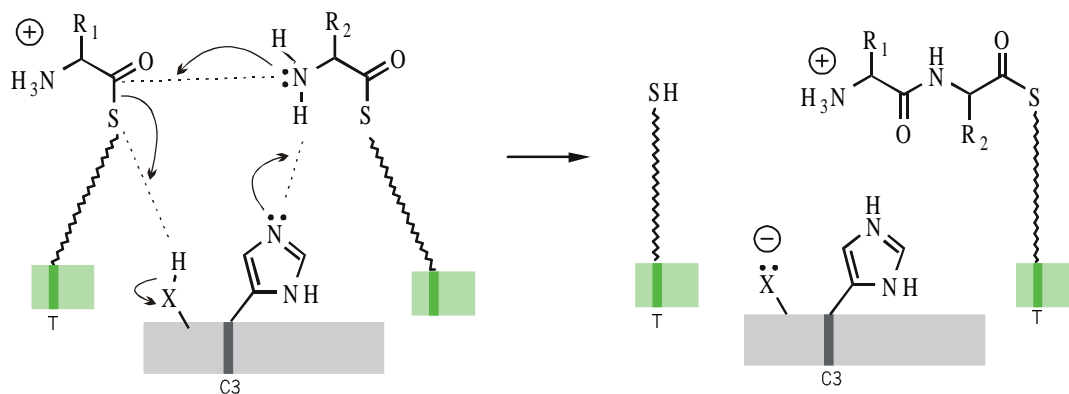


Abbildung 2-8 Vorgeschlagener Mechanismus der Elongationsreaktion in der nicht-ribosomalen Peptidsynthese.

In einem Enzym-Assay ist es kürzlich gelungen, durch Inkubation von rekombinantem GrsA mit einem TycB1-Modul-Protein (ProCAT, bestehend aus C-, A- und T-Domäne) in Gegenwart der Substrataminosäuren (Phe und Pro) und ATP die Bildung des zu erwartenden Produkt-Dipeptides (Phe-Pro) nachzuweisen. Durch eine Mutation des zweiten Histidinrestes des C3-Motivs von ProCAT (H147V) verlor dieses System die Fähigkeit zur Peptidbildung. Da durch die Mutation jedoch die Adenylierungs- und Thiolierungseigenschaften von ProCAT nicht beeinträchtigt wurden, konnte somit zum erstenmal die Rolle der C-Domäne bei der Elongationsreaktion der nicht-ribosomalen Peptidsynthese experimentell nachgewiesen werden [Stachelhaus *et al.*, 1998].

2.6.4 Die Thioesterase-Te-Domäne

Die ca. 250 Aminosäuren großen Te-Domänen werden häufig an den C-terminalen Enden von Modulen gefunden, die für den Einbau der letzten Aminosäure des Produktpeptides verantwortlich sind (vgl. Abbildung 2-4 und Kapitel 7.1). Sie besitzen Homologie zu Thioesterase-Domänen, wie sie in modularen Polyketid- und Fettsäure-Synthasen gefunden werden [Pazirandeh *et al.*, 1989; Pazirandeh *et al.*, 1991; Cortes *et al.*, 1995]. In diesen Systemen sind die Thioesterase-Domänen an der Abspaltung der gebildeten Produkte vom Enzym beteiligt. Aus diesem Grund wird auch für die Te-Domänen aus PPS eine ähnliche Funktion angenommen. Hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, daß bei einer bloßen Hydrolyse der als Thioester gebundenen Peptide ausschließlich lineare Produkte entstünden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den vielen zyklischen Strukturen von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden (vgl. Abbildung 2-2 und Tabelle 2-3). Insofern ist es interessant, daß Thioesterasen und Acyltransferasen ein ähnliches katalytisches Zentrum besitzen (Core Te, vgl. Abbildung 2-5) [Marahiel *et al.*, 1997]. Eine weitere Funktion der Te-Domäne könnte daher auch in einem Acyltransfer liegen, der bei einer intramolekularen Reaktion eines linearen Peptides zu einer zyklischen oder verzweigt zyklischen Struktur führt.

Obwohl der Funktionsmechanismus der Te-Domäne noch nicht nachgewiesen werden konnte, zeigen neuere Untersuchungen die essentielle Rolle dieser Domäne in der nicht-ribosomalen Synthese am Beispiel von Surfactin oder ACV-Tripeptid [Kennedy *et al.*, 1996; Schneider & Marahiel, 1998a]. In beiden Systemen führte die Deletion der Te-Domäne zu einer totalen Inhibition der Peptidsynthese. Überdies konnte durch genetische Fusionen einer Te-Domäne mit internen Modulen des SrfA-Systems die Produktion von verkürzten Surfactin-Varianten induziert werden [de Ferra *et al.*, 1997]. Hierdurch wird einmal mehr die Rolle dieser Domäne an der Termination der nicht-ribosomalen Peptidsynthese und der Freisetzung des Produktpeptides unterstrichen.

2.6.5 Die Epimerisierungs-E-Domäne

Bei Modulen, die D-Aminosäuren in das Produktpeptid einbauen, konnte ein weiterer Domäentyp identifiziert werden. Diese E-Domänen von ca. 450 Aminosäuren Länge schließen sich hierbei direkt C-terminal an das entsprechende AT-Minimalmodul an (vgl. Abbildung 2-4 und Kapitel 7.1). Untersuchungen an Verkürzungsmutanten von GrsA und TycA bewiesen die Bedeutung dieser Bereiche für die Epimerisierung der als Thioester gebundenen Aminosäuren [Vater & Kleinkauf, 1976; Stachelhaus & Marahiel, 1995a; Stein *et al.*, 1995]. In Systemen, die derartige E-Domänen in Verbindung mit internen oder C-terminalen Modulen tragen, wird allerdings keine Epimerisierung der als Thioester gebundenen Aminosäuren beobachtet. Die Epimerisierung erfolgt hierbei erst, wenn die wachsende Peptidkette mit der entsprechenden Aminosäure über eine Peptidbindung verknüpft wurde und als Thioester an dem entsprechenden ATE-Modul gebunden vorliegt [Schwecke *et al.*, 1992; Stindl & Keller, 1994; Shiao *et al.*, 1995].

Sequenzvergleiche der E-Domänen zeigten keine signifikanten Homologie zu bisher bekannten Aminosäure-Epimerasen oder N-Acylracemasen [Cardinale *et al.*, 1968; Galakatos *et al.*, 1987; Faraci *et al.*, 1988; Gallo *et al.*, 1993]. Innerhalb der E-Domänen lassen sich jedoch mindestens 7 hochkonservierte Core-Motive (vgl. Abbildung 2-5) identifizieren, von denen das E2-Motiv ausgesprochene Ähnlichkeit zum C3-Motiv von C-Domänen aufweist.

Nach einer Interpretation von de Crecy-Lagard *et al.* könnte auch hier der konservierte Histidin-Rest als Base an der Reaktionskatalyse beteiligt sein und zur Epimerisierung beitragen [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995].

2.6.6 Die N-Methylierungs-M-Domäne

Module, die N-methylierte Aminosäuren in die wachsende Peptidkette inkorporieren werden durch eine ca. 420 Aminosäuren große Insertion zwischen der A- und T-Domäne erweitert (vgl. Abbildung 2-4 und Kapitel 7.1). Diese sogenannte M-Domäne besitzt 3 Core-Motive (vgl. Abbildung 2-5) von denen das Glycin-reiche M1-Motiv Ähnlichkeiten zu der üblichen S-Adenosinmethionin- (SAM) Bindungsstelle von diversen SAM-abhängigen Methyltransferasen aufweist [Brooks *et al.*, 1991; Blattner *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993; Aparicio *et al.*, 1996]. Studien an rekombinanten Enniatin Synthetase-Modulen konnten die Beteiligung der M-Domäne an der N-Methylierung von Thioester-gebundenen Aminosäuren belegen [Billich & Zocher, 1987; Haese *et al.*, 1994; Pieper *et al.*, 1995].

2.7 Das Peptid-Antibiotikum Bacitracin

Bacitracin gehört zu der Gruppe von Peptid-Antibiotika, die von speziellen Stämmen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* produziert werden. Erstmals wurde ein Bacitracin produzierender Stamm 1943 von Johnson und seinen Mitarbeitern aus der Wunde eines 7 Jahre alten Mädchen, Margret Tracy, isoliert. In der folgenden Zeit entwickelte sich dann kurioserweise aus dem Namen des Produzenten und dem Nachnamen des Mädchen die Nomenklatur des Peptid-Antibiotikum [Johnson *et al.*, 1945; Hickey, 1964].

Die antibiotische Aktivität von Bacitracin richtet sich in erster Linie gegen andere Gram-positive Bakterien. Seine Wirkung wird in erster Linie auf eine Inhibierung der Zellwandbiosynthese zurückgeführt, indem es in den Zielorganismen C₅₅-Isoprenyl-Pyrophosphat (IPP) komplexiert (vgl. Abbildung 2-9) [Stone *et al.*, 1971; Storm *et al.*, 1973]. IPP fungiert in der Zellwandbiosynthese als Membran assoziierter *Carrier*, der sich wiederholende Einheiten von Peptidoglycan durch die Zellmembran transportiert. Zum Recycling von IPP muß es am Ende eines jeden Transportzyklus durch eine Phosphatase zu C₅₅-Isoprenyl-Phosphat dephosphoryliert werden. Dieser Schritt wird durch die Bildung des Bacitracin-Komplexes inhibiert und führt zu einer Akkumulation an UDP-Acetylmuramyl-Pentapeptid. Überdies übt Bacitracin aber auch Einflüsse auf die Proteinbiosynthese und Membranfunktionen aus [Rieber *et al.*, 1969; Makinen, 1972; Schechter *et al.*, 1972]. In Kombination mit anderen Antibiotika wie z. B. Polymyxin B und Neomycin wurde Bacitracin anfänglich zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt [Brunner, 1965]. Seine wirtschaftlich wichtigste Bedeutung liegt jedoch in der Verwendung als Wachstumspromotor in der modernen Tiermast. Hierbei wird es den Futtermitteln in Konzentrationen von 5-100 ppm zugesetzt und führt bei den entsprechenden Tieren zu einer raschen und effektiven Gewichtszunahme [Frøyskov, 1984]. Die Mechanismen, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sind noch weitgehend unbekannt. Es wird jedoch angenommen, daß Bacitracin einen positiven Effekt auf die Darmflora der behandelten Tiere ausübt [Walton, 1981].

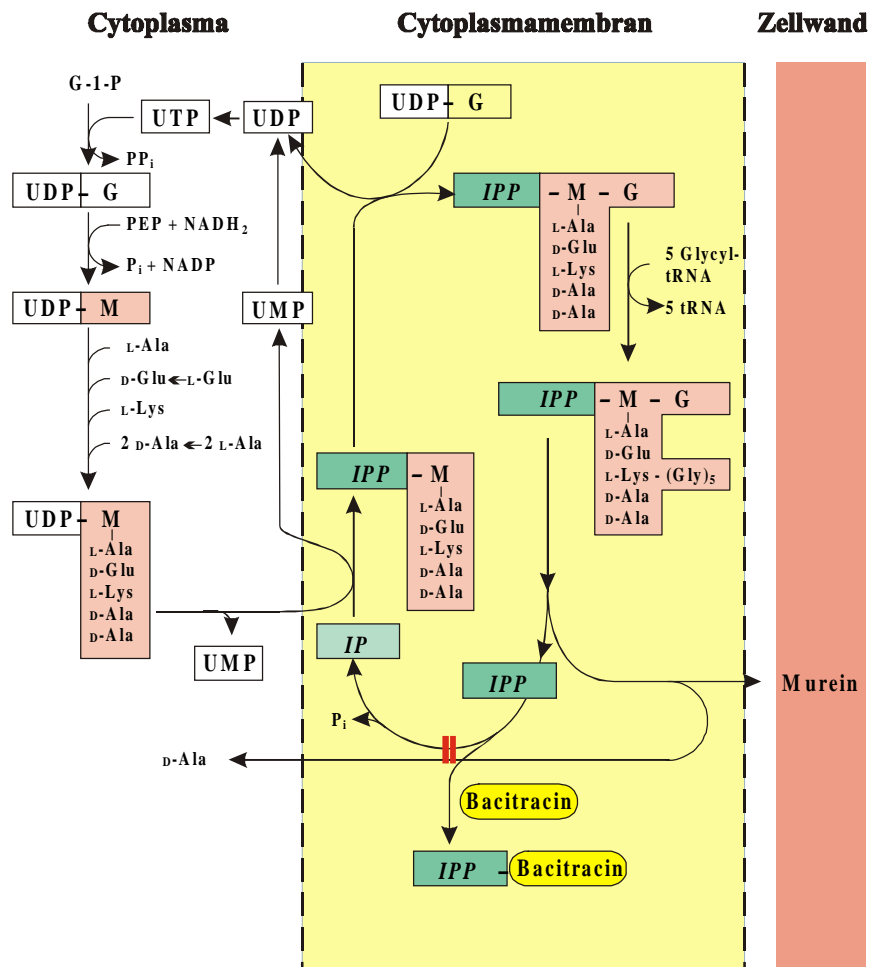


Abbildung 2-9 Inhibierung der Zellwand-Biosynthese in Gram-positiven Organismen durch Bacitracin (vgl. Text). Abkürzungen: M, Mureinsäure; G, N-Acetylglucosamin; IPP, Isoprenylpyrophosphat.

Bacitracin A ist ein verzweigt-zyklisches Dodecylpeptid, das an seinem N-Terminus eine lineare Pentapeptid-Einheit (Ile¹-Ile⁵) und am C-Terminus einen Heptapeptid-Zyklus (Lys⁶-Asn¹²) trägt (vgl. Abbildung 2-10). Als strukturelle Besonderheit weist es zwischen den beiden Aminosäuren Ile¹ und Cys² einen Thiazolinring auf, der, wie biochemische Untersuchungen gezeigt haben, bereits auf der Stufe des Dipeptides generiert wird [Ishihara *et al.*, 1979; Ishihara *et al.*, 1988]. Neben proteinogenen Aminosäuren werden 4 Aminosäuren in der D-Form und das nicht-proteinogene Ornithin in das Peptid eingebaut.

Ähnlich wie bei Gramicidin S und Tyrocidin wird die Synthese von einem großen Multienzymkomplex, der aus den Bacitracin-Synthetasen 1-3 besteht, katalysiert (vgl. Abbildung 2-10) [Frøyshov *et al.*, 1974; Ishihara *et al.*, 1974; Kleinkauf & von Döhren, 1990b]. Die Bacitracin-Synthetase 1 (BA1) ist für die Aktivierung der 5 Aminosäuren des N-Terminus verantwortlich. Die Bacitracin-Synthetasen 2 und 3 aktivieren und bauen die Aminosäuren des C-terminalen Heptapeptid-Zyklus ein. Die Gene der Bacitracin-Synthetasen liegen 'geclustert' vor und es wird eine dem *grs* bzw. *srfA* Operon ähnliche Organisation angenommen [Ishihara *et al.*, 1989].

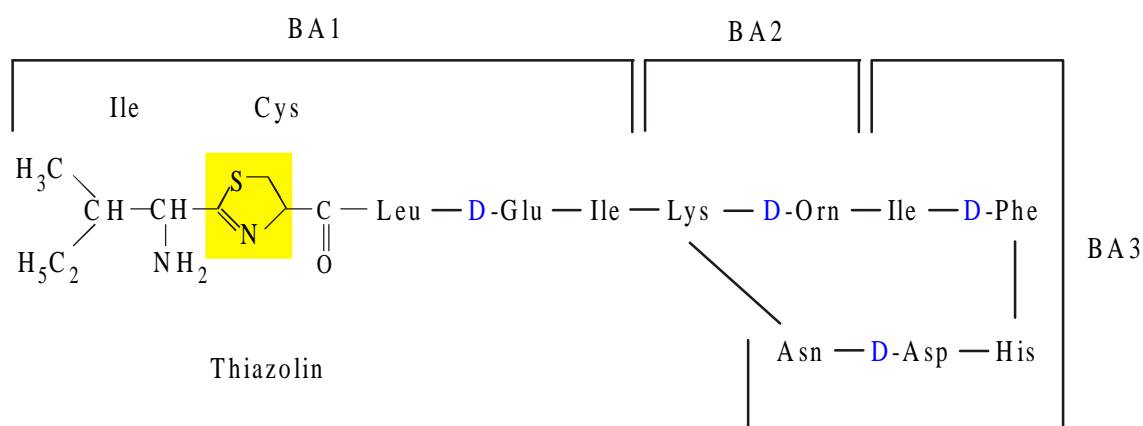


Abbildung 2-10 Primärstruktur von Bacitracin A. Aminosäuren in D-Konformation sind blau markiert. Durch die Einrahmungen wird dargestellt, welche Aminosäuren durch die Bacitracin Synthetasen BA1, 2 und 3 aktiviert und eingebaut werden.

2.8 Lichenysine – Lipopeptide aus *B. licheniformis*

Eine Vielzahl von *Bacillus* Stämmen produzieren Lipopeptide mit zum Teil bemerkenswerten physikochemischen Eigenschaften [Fiechter, 1992; Desai *et al.*, 1997]. Eine der am besten charakterisierten Verbindung dieser Gruppe repräsentiert das von *B. subtilis* produzierte Surfactin (vgl. Abbildung 2-2) [Arima *et al.*, 1968]. Hierbei handelt es sich um ein acyliertes, zyklisches Heptapeptid, das bereits in Konzentrationen unterhalb von 0,05 % die Oberflächenspannung des Wassers von 72 auf 27 mN·m⁻¹ reduziert und somit zu den stärksten bisher charakterisierten Biotensiden zählt. Darüber hinaus besitzt es aber auch antibakterielle, fungizide und antivirale Eigenschaften. Neben Surfactin produzieren einige *B. subtilis* Stämme aber auch noch andere Lipopeptide wie z. B. Iturin [Peypoux *et al.*, 1978; Quentin *et al.*, 1982], Bacillomycin [Besson *et al.*, 1977], Fengycin [Vanittanakom *et al.*, 1986], Plipastatin [Nishikiori *et al.*, 1986] oder Subsporin [Ebata *et al.*, 1969].

Auch einige *B. licheniformis* Stämme produzieren Lipopeptide, die allgemein als Lichenysine bezeichnet werden (vgl. Tabelle 2-4) [Horowitz *et al.*, 1990; McInerney *et al.*, 1990; Jenny *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994; Yahimov *et al.*, 1995]. Im Gegensatz zu *B. subtilis* können diese *Bacillus* Stämme jedoch gleichermaßen unter anaeroben Bedingungen wachsen und Lipopeptide synthetisieren. So wurde auch die Mehrzahl der bisher charakterisierten Lichenysin Produzenten aus recht ungewöhnlichen Habitaten wie z. B. Erdölförderstätten isoliert [Jenneman *et al.*, 1983; Horowitz *et al.*, 1990; Yahimov *et al.*, 1995]. Die produzierten Lichenysine können bezüglich ihres Peptidanteils mit der allgemeinen Sequenz Glx-Leu-DLeu-Val-Asx-DLeu-Ile/Leu/Val beschrieben werden. Strukturell unterscheiden sie sich also nur geringfügig von Surfactin und weisen somit auch vergleichbare physikochemische und biologische Aktivitäten auf. Innerhalb der Lichenysin-Gruppe treten Stamm spezifische Variationen des Peptidanteils auf, die ausschließlich auf die erste, fünfte und siebente Aminosäureposition beschränkt sind. Anhand der schon erwähnten strukturellen Homologie zu Surfactin kann davon ausgegangen werden, daß auch die Lichenysine nicht-ribosomal synthetisiert werden.

Tabelle 2-4 Lipoheptapeptide aus *Bacillus* spp.

Name		Organismus	Struktur								Referenz
Lichenysin	A	<i>B. licheniformis</i>	FA ^a -	L ⁺ Glu-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asn-	DLeu-	L ⁺ Ile	[Yahimov <i>et al.</i> , 1995; Yakimov <i>et al.</i> , 1996]
	B		FA ^a -	L ⁺ Glu-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asp-	DLeu-	L ⁺ Leu	[McInerney <i>et al.</i> , 1990; Lin <i>et al.</i> , 1994]
	C		FA ^a -	L ⁺ Glu-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asp-	DLeu-	L ⁺ Ile	[Jenny <i>et al.</i> , 1991]
	D		FA ^a -	L ⁺ Gln-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asp-	DLeu-	L ⁺ Ile	diese Arbeit
Surfactant	86		FA ^a -	L ⁺ Glx ^d -	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asx ^d -	DLeu-	L ⁺ Ile ^e L ⁺ Val	[Horowitz <i>et al.</i> , 1990; Horowitz <i>et al.</i> , 1991]
Surfactin		<i>B. subtilis</i>	FA ^a -	L ⁺ Glu-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asp-	DLeu-	L ⁺ Leu	[Arima <i>et al.</i> , 1968; Ullrich <i>et al.</i> , 1991; Cosmina <i>et al.</i> , 1993]
Esperin		<i>B. subtilis</i>	FAb-	L ⁺ Glu-	LLeu-	DLeu-	LVal-	L ⁺ Asp-	DLeu-	L ⁺ Leu ^e L ⁺ Val	[Thomas <i>et al.</i> , 1969]
Iturin	A	<i>B. subtilis</i>	FAC-	L ⁺ Asn-	D ⁺ Tyr-	DAsn-	L ⁺ Gln-	L ⁺ Pro-	DAsn-	L ⁺ Ser	[Peypoux <i>et al.</i> , 1978]
	C		FA ^c -	L ⁺ Asn-	D ⁺ Tyr-	DAsn-	L ⁺ Gln-	L ⁺ Pro-	D ⁺ Asn ^e D ⁺ Ser-	L ⁺ Asn ^e L ⁺ Thr	[Quentin <i>et al.</i> , 1982]
Bacillomycin	L	<i>B. subtilis</i>	FA ^c -	L ⁺ Asp-	D ⁺ Tyr-	DAsn-	L ⁺ Ser-	L ⁺ Gln-	D ⁺ Pro ^e D ⁺ Ser-	L ⁺ Thr	[Besson <i>et al.</i> , 1977]
	D		FA ^c -	L ⁺ Asp-	D ⁺ Tyr-	DAsn-	L ⁺ Pro-	L ⁺ Glu-	D ⁺ Ser-	L ⁺ Thr	[Peypoux <i>et al.</i> , 1980; Peypoux <i>et al.</i> , 1981]

^a FA = β -Hydroxyfettsäure. Die β -Hydroxyfunktion ist über eine Esterbindung mit der Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure verknüpft.

^d FA = β -Hydroxyfettsäure. Die β -Hydroxyfunktion ist über eine Esterbindung mit der Carboxygruppe von Asp5 verknüpft.

^c FA = β -Aminofettsäure. Die β -aminofunktion ist über eine Peptidbindung mit der Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure verknüpft.

^d Nur die folgenden kombinationen der Aminosäuren 1 und 5 sind erlaubt: Gln/Asp oder Glu/Asn.

^e Positionen an denen zwei alternative Aminosäuren eingebaut werden können

2.9 Aufgabenstellung

Die Bacitracin-Synthetasen waren in den 70er und 80er Jahren Gegenstand intensiver biochemischer Untersuchungen, so daß ihre enzymologischen Eigenschaften bereits weitgehend charakterisiert werden konnten [Frøyshov, 1984; Ishihara & Shimura, 1988; Kleinkauf *et al.*, 1990a]. Hinsichtlich der molekulargenetischen Organisation der Synthetasegene war zu Beginn dieser Arbeit dagegen nur wenig bekannt. So waren zwar bereits eine genetische Kartierung [Podlesek *et al.*, 1987] und teilweise Klonierung der Synthetasegene [Ishihara *et al.*, 1989] durchgeführt worden, aber Sequenzdaten, die Aufschlüsse über die Domänenstruktur der Bacitracin-Synthetasen liefern könnten, lagen nicht vor. Dies ist aber gerade im Falle des Bacitracins von besonders großem Interesse, da es mit seinen 12 Aminosäuren ein großes Informationspotential für die weitere Aufklärung der Domänenstruktur von PPS in sich birgt. Dies gilt insbesondere für die Domänen, die an der Aktivierung und Prozessierung der Aminosäuren des ungewöhnlichen Thiazolinringes beteiligt sind. Da Bacitracin darüber hinaus einige Aminosäuren enthält, die in anderen nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden nur selten auftreten (Cys², Lys⁶ und His¹⁰), ist die Analyse der Synthetasegene auch in Hinblick auf die Bereitstellung eines großen Pools an Aminosäure-aktivierenden Domänen interessant. Diese können innerhalb von PPS durch genetische Rekombinationstechniken ausgetauscht werden, so daß die generierten Hybridsynthetasen zur Produktion von Peptiden mit veränderter Primärsequenz führen [Stachelhaus *et al.*, 1995b; Stachelhaus *et al.*, 1996b; Schneider *et al.*, 1998b].

Aufgabe dieser Arbeit war es, das Bacitracin-Biosynthese-Operon aus *B. licheniformis* ATCC 10716 zu identifizieren, zu klonieren und molekularbiologisch sowie biochemisch zu charakterisieren.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 3-1 Verwendete Geräte, Hersteller und Typenbezeichnungen

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autom. DNA-Sequenzanalyse	<i>PE Applied Biosystems</i> ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer
Blot-Apparatur	<i>Stratagene</i> Posiblot™ Pressure Blotter & Pressure Control Station
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	Videokamera <i>Cybertech</i> CS 1 Thermodrucker <i>Mitsubishi</i> Video Copy Processor
Elektroporationssystem	<i>Biorad</i> Gene® Pulser II
FPLC-System	<i>Pharmacia</i> FPLC-System 250 bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500 (2x), Uvicord Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 und "chelating"-Superose-Säule HR 10/2
HPLC-System	<i>Pharmacia</i> HPLC-System 250 bestehend aus: Kontrolleinheit 2252, Gradientenpumpe 2248, Niederdruck-Gradientenmischer, Monitor VWM2141 (2 variable Wellenlängen), Motor-Injektionsventil PMV-7, Lösungsmittelentgaser Degasys 1310, Fraktionssammler FRAC-100 und Analyse-Software EZChrom™ Chromatography Data System
Hybridisierungssofen	<i>Bachhofer</i> Hybridisierungssofen Mini 38
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Serries 25 Incubator Shaker
Mikrotiterplattenlesegerät	<i>Dynatech</i> MR7000
Photometer	<i>Uvikon</i> 940 Spectrometer <i>Pharmacia</i> Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer
Pulsfeld-Gelelektrophorese	<i>Hoefer</i> PC 500 SwitchBack™ Pulse Controller & HE 100 SuperSub™ Horizontal Unit
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Speed-Vac	<i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Szintillationszähler	<i>Packard</i> 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer
Thermocycler	<i>Perkin Elmer</i> Thermal Cycler 480 <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR System2
Ultrafiltrationseinheit	<i>Amicon</i> Rührzelle 8050
Ultraschallbad	<i>Bandelin</i> Sonorex Super RK103H
UV-Inkubator	<i>Stratagene</i> Stratalinker [®] UV Crosslinker Model 1800
Vakuumpumpe	<i>Vacuubrand</i> Membran-Vakuumpumpe MZ2C
Wasserbad	<i>Infors</i> Aquatron Rundschüttelmaschine
Zellaufschluß	<i>SLM Aminco</i> French [®] Pressure Cell Press
Zentrifugen	<i>Beckman</i> Spinco L2 65B <i>Heraeus</i> Mikrofuge <i>pico</i> <i>Heraeus</i> Minifuge RF <i>Sorvall</i> RC 26 Plus

3.2 Enzyme und Chemikalien

Chemikalien, die in der nachfolgenden Tabelle nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen *Merck* (Darmstadt) oder *Sigma* (Deisenhofen) in *p.a.* Qualität bezogen.

Tabelle 3-2 Enzyme und Chemikalien

Firma	Produkt(e)
<i>AGS</i> (Heidelberg)	PARR-Puffer und <i>Taq</i> -Polymerase
<i>Amersham/Buchler</i> (Braunschweig)	Hybond N ⁺ -Nylonmembran, λ-DNA, Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme
<i>Biomol</i> (Ilvesheim)	DTT und DTE
<i>Boehringer Mannheim</i> (Mannheim)	Alkalische Phosphatase, Expand [™] Long Template PCR System, <i>Blocking</i> -Reagenz und Lysozym
<i>Difco</i> (Detroit, USA)	Nutrient Broth u. Casein-Hydrolysat
<i>Du Pont/NEN</i> (Bad Homburg)	[³² P]-Pyrophosphat (16 Ci·mmol ⁻¹)
<i>Eurogentec</i> (Seraing, Belgien)	Agarose und Elektroporationsküvetten

Firma	Produkt(e)
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	TEMED
<i>Hartmann Analytik</i> (Braunschweig)	L-Cystein [³⁵ S] (1,0 Ci·mol ⁻¹) und L-Isoleucin [¹⁴ C(U)] (240 mCi·mmol ⁻¹)
<i>Gibco/BRL</i> (Eggenstein)	Agarose, Acrylamid und Bisacrylamid
<i>MWG-Biotech</i> (Ebersberg)	synthetische Oligonukleotide
<i>New England Biolabs</i> (Beverly, USA)	MidRange PFG Marker I
<i>Kodak</i> (Rochester, USA)	Röntgenfilm X-Omat AR und Biomax MR
<i>Oxoid</i> (Wesel)	Agar Nr. 1, Trypton und Schafsblut
<i>PE Applied Biosystems</i> (Weiterstadt)	ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
<i>Qiagen</i> (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, QIAquick-spin PCR Purification Kit, QIAexpress Vector Kit ATG und Ni-NTA-Agarose
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Acetonitril, β-ME, EtBr, Phenol und TCA
<i>Schleicher & Schüll</i> (Dassel)	Sterilfilter (0,45 µm Porengröße) und Whatmann-3MM-Papier
<i>Serva</i> (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylen-Cyanol, Triton X-100 und Tween™ 20
<i>Stratagene</i> (Heidelberg)	pBluescript-Vektoren, pCR-Script Cloning Kit, Undigested Lambda EMBL III Gigapack® Cloning Kit und Gigapack® III Gold Packaging Extracts
<i>United States Biochemicals</i> (Bad Homburg)	Ampicillin, Kanamycin, Hefe-Extrakt, Agar Nr.1 APS, X-Gal, IPTG, RbCl, Coomassie Brilliant Blue G und R250

3.3 Mikroorganismen

Tabelle 3-3 Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>B. licheniformis</i> ATCC 10716	Wildtyp-Stamm, Bacitracin-Produzent [Johnson <i>et al.</i> , 1945]
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent [Cooper <i>et al.</i> , 1981]

Stamm	Genotyp
<i>B. subtilis</i> JH642	Surfactin-Nichtproduzent, <i>pheA1</i> , <i>trpC2</i> , <i>sfp</i> ⁰ [Hoch <i>et al.</i> , 1973]
<i>E. coli</i> JM105	<i>thi-1</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>sbcBC</i> , <i>hsdR4</i> , (<i>lac-proAB</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>] [Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Tn10 (Tet ^r)] [Bullock <i>et al.</i> , 1987]
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRA	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ^c [Jerpseth <i>et al.</i> , 1993]
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRA (P2)	XL1-Blue MRA (P2 lysogen) ^c [Jerpseth <i>et al.</i> , 1993]
<i>E. coli</i> M15	<i>nals</i> , <i>strs</i> , <i>rifs</i> , <i>lac</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtl</i> , F [Zamenhof <i>et al.</i> , 1972]
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> [Studier <i>et al.</i> , 1986; Grodberg <i>et al.</i> , 1988]
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	[Schleifer <i>et al.</i> , 1972]

3.4 Vektoren

3.4.1 pBluescript II SK –

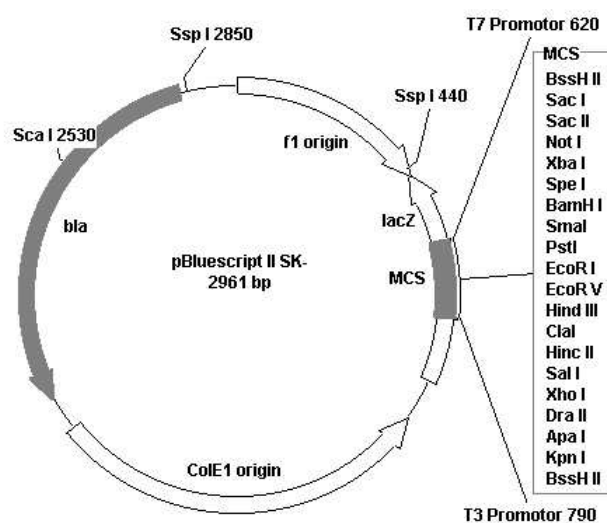


Abbildung 3-1 Physikalische Karte des Plasmides pBluescript II SK -

Der Vektor pBluescript II ist ein 2961 bp großes Derivat von pUC19 [Vieira *et al.*, 1982]. Er enthält das für das α -Peptid der β -Galactosidase kodierende *lacZ'*-Gen, das bei Insertion in die MCS unterbrochen wird und so eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt. Der ColE1-Ursprung für *E. coli* (ori) aus pBR322 [Bolivar *et al.*, 1977] ermöglicht die Replikation in *E. coli* und das Produkt des β -Lactamase-Gens vermittelt die Ampicillinresistenz. Ferner ermöglicht der Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 (f1 origin) in Anwesenheit eines Helferphagen die Synthese von ssDNA. Die MCS wird von den T3- und T7-Promotoren flankiert, so daß eine gezielte Expression der klonierten Gene möglich ist.

3.4.2 pCR-Script SK +

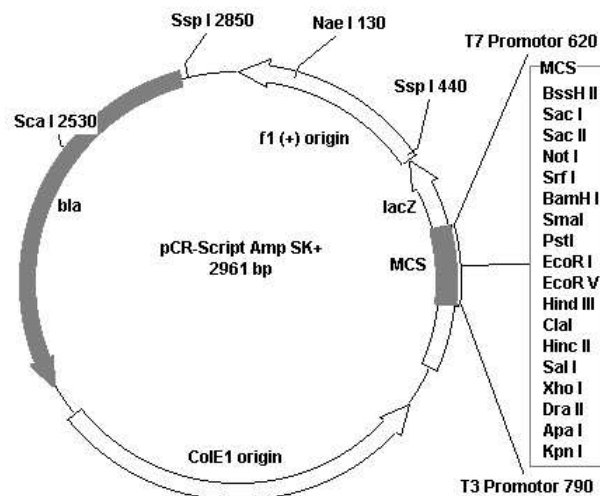


Abbildung 3-2 Physikalische Karte des Plasmides pCR Script SK +

Das Plasmid pCR-Script SK(+) wurde zur Klonierung amplifizierter PCR-Fragmente in Verbindung mit dem pCR-Script-Klonierungskit verwendet (vgl. Kapitel 14.2.3). Das Phagemid basiert auf dem Plasmid pBluescript SK(+), besitzt jedoch zusätzlich die Oktanukleotid-Erkennungssequenz (5'-GCCCCGGG-3') des selten schneidenden Restriktionsenzym *Srf* I in seiner MCS.

3.4.3 pQE60 und pQE70

Die pQE60- und pQE70 Vektoren gehören zur Familie der pDS-Plasmide [Bujard *et al.*, 1987] und basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII [Stüber *et al.*, 1990]. Sie wurden zur Klonierung von PCR-Fragmenten herangezogen und gestatteten die Expression dieser DNA-Fragmente in Fusion mit sechs repetitiven, C-terminalen Histidinkodonen (6xHis-tag). Die Plasmide tragen das β -Lactamase-Gen und den Replikationsursprung für *E. coli* aus pBR322 [Scutcliffe, 1979]. Sie besitzen darüber hinaus ein optimiertes Promotor/Operator-Element bestehend aus dem T5-Promotor des entsprechenden *E. coli*-Phagen sowie zwei *lac*-Operatorsequenzen. Die synthetische ribosomale Bindungsstelle RBS II wurde in Hinblick auf eine optimale mRNA-Erkennung und -Bindung konstruiert. Die MCS enthält drei

Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen, wobei das ATG-Startkodon in eine *Nco* I- (pQE60) bzw. eine *Sph* I- (pQE70) Erkennungssequenz integriert wurde und sich in bestmöglichen Abstand zur RBS befindet. Hinter dem Polylinker befindet sich die Kodierungssequenz des 6xHis-tag, gefolgt von Translationsstopkodonen in allen drei Leserastern. Ergänzend besitzt das Plasmid den Transkriptionsterminator t_0 des λ -Phagen [Schwartz *et al.*, 1987].

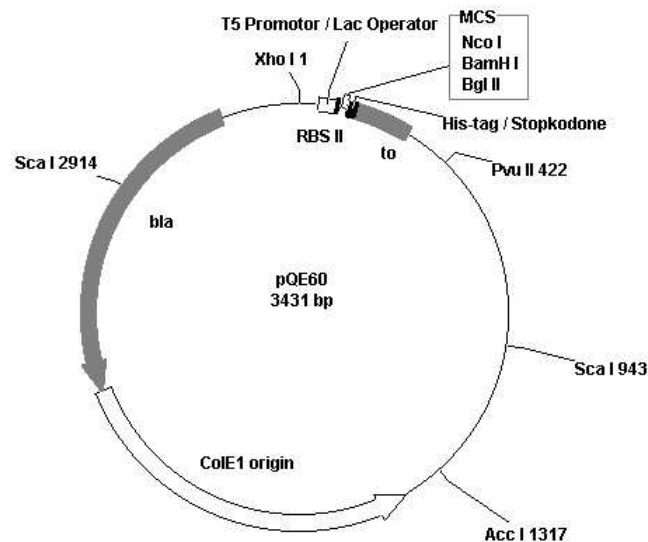


Abbildung 3-3 Physikalische Karte des Plasmides pQE60. Der pQE70-Vektor ist identisch aufgebaut, enthält in seiner MCS jedoch eine *Sph* I-Erkennungssequenz.

3.4.4 pREP4

Die Genexpression im Plasmid pQE60 ist aufgrund der optimierten Promotor/Operator-Region sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher *lac*-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Die von der *E. coli*-Wirtszelle bereitgestellte Menge reicht hierfür nicht aus, so daß ein zweites Plasmid, pREP4, benötigt wird, um eine kontrollierte Expression der His-tag-Fusionen zu gewährleisten. Dieses Plasmid trägt das den *lac*-Repressor-kodierende *lacI*-Gen [Farabough, 1978] sowie das *neo*-Gen, dessen produkt eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Aufgrund einer Mutation in der RBS produziert pREP4 weniger Neo, so daß 25 µg/mL Kanamycin zur Selektion Plasmid tragender Zellen ausreichen. pREP4 ist aufgrund seines Replikationsursprungs kompatibel zu allen Plasmiden, die einen ColE1-Ursprung tragen (z. B. pQE60). Das spezielle Doppel-Operatorsystem im pQE60-Vektor erlaubt in Kombination mit dem hohen Niveau an *lac*-Repressor, das vom Plasmid pREP4 produziert wird, eine sehr dosierte und kontrollierte Expression der klonierten Genfragmente.

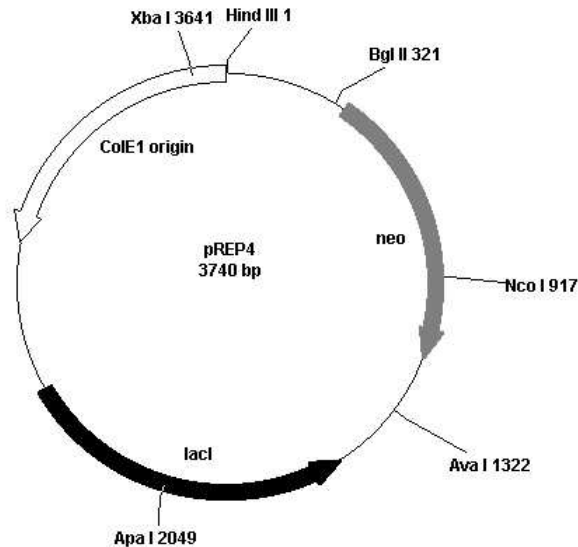


Abbildung 3-4 Physikalische Karte des Plasmides pREP4

3.5 Medien

Für die Anzucht von *E. coli*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* und *M. luteus* wurde 2xYT-Medium verwendet.

2xYT-Medium	Bactotrypton	16	g·L ⁻¹
	Hefeextrakt	10	g·L ⁻¹
	NaCl	5	g·L ⁻¹

M9-Medium diene als Minimalmedium zur Aufbewahrung der *E. coli*-Stämme. Zur Anfertigung des Mediums wurden Lösung I und II getrennt autoklaviert, im Verhältnis 89:10:1 (H₂O: Lsg. I : Lsg. II) gemischt und mit 1 mL steriltfiltriertem 1 M Thiaminiumdichlorid versetzt.

M9-Medium Lösung I (pH 7,4)	Na ₂ HPO ₄	60	g·L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	30	g·L ⁻¹
	NaCl	5	g·L ⁻¹
	NH ₄ Cl	10	g·L ⁻¹
Lösung II	CaCl ₂	2,2	g·L ⁻¹
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	24,6	g·L ⁻¹
	Glucose	200	g·L ⁻¹

Als Sporulationsmedium für *B. licheniformis* und *B. subtilis* diene Difco- Sporulationsmedium (DSM).

DSM-Medium	Nutrient Broth	8	g·L ⁻¹
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,12	g·L ⁻¹
	KCl	1	g·L ⁻¹
	1 M NaOH	0,6	mL

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit je 1 mL der folgenden Lösungen versetzt :

Ca(NO ₃) ₂	1	M
MnCl ₂	0,1	M
FeSO ₄	1	mM

Für die Lambda-Phageninfektion wurde NZY-Medium verwendet.

NZY-Medium (pH 7,5)	NaCl	5	g·L ⁻¹
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2	g·L ⁻¹
	Hefeextrakt	5	g·L ⁻¹
	NZ Amin (Casein-Hydrolysat)	10	g·L ⁻¹
NZY-Agar	Agar	1,5	% (w/v)
NZY-Topagar	Agar	0,7	% (w/v)

Für die Präparation von Bacitracin aus Kulturüberständen wurde *B. licheniformis* in M20-Medium kultiviert.

M20-Medium (pH 6.0)	L-Glutaminsäure	20,0	g·L ⁻¹
	L-Alanin	0,2	g·L ⁻¹
	Citrussäure	1,0	g·L ⁻¹
	NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	20,0	g·L ⁻¹
	KCl	0,5	g·L ⁻¹
	Na ₂ SO ₄	0,5	g·L ⁻¹
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2	g·L ⁻¹
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01	g·L ⁻¹
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01	g·L ⁻¹
	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,01	g·L ⁻¹

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit Agar Nr. 1 (Oxoid) versetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medien vor dem Gebrauch 20 min bei 121°C (zuckerhaltige Lösungen bei 110°C) und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z. B. Antibiotika wurden den Medien als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50°C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt : Amp 50 µg·mL⁻¹, Kan 25 µg·mL⁻¹, X-Gal 40 µg·mL⁻¹ und IPTG 50 µg·mL⁻¹.

4 Methoden

4.1 DNA-Präparation

4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die im folgenden beschriebene Methode zur Präparation von Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Zellwandlyse [Birnboim *et al.*, 1979]. Hierbei werden *E. coli* Zellen alkalisch lysiert, was zu einer Denaturierung der chr. DNA führt, wohingegen Plasmid-DNA aufgrund ihrer superhelikalen Form noch stabil ist. Wird im Anschluß das Zellysat mit KOAc neutralisiert, fällt ein Komplex aus Zelltrümmern, Proteinen und chromosomaler DNA aus, während die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt und gesondert aufgereinigt werden kann.

Die Zellen einer 2 mL üN-Kultur (2xYT) wurden für 5 min abzentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und RT). Das Zellpellet wurde in 300 µL P1-Puffer resuspendiert, mit 300 µL P2-Puffer versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µL P3-Puffer (eisgekühlt) hinzugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und 4°C). Der Überstand wurde sofort abgenommen und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 600 µL Isopropanol versetzt. Es wurde 30 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und RT), der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 mL 70 %igem EtOH gewaschen, 10 min in einer Speed-Vac getrocknet und in 50 µL Tris-Puffer gelöst.

Wurde hochreine Plasmid-DNA benötigt (z. B. für die DNA-Sequenzierung), so konnte die gelöste Plasmid-DNA nachgereinigt werden. Hierzu wurde mit 800 µL QBT-Puffer versetzt und auf eine *Qiagen* tip20-Anionenaustauschersäule aufgetragen, welche zuvor mit 1 mL QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde viermal mit 1 mL QC-Puffer gewaschen und die Plasmid DNA anschließend mit 800 µL QF-Puffer eluiert. Zur Fällung der DNA wurde das Eluat mit 0,7 Volumen (560 µL) Isopropanol versetzt und wie zuvor beschrieben präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 20 µL Tris-Puffer gelöst.

Zur Präparation größerer Plasmidmengen wurden die Zellen einer 200 mL üN-Kultur (2xYT) aufgearbeitet. Die Aufarbeitung des Zellpellets erfolgte mit je 4 mL P1-, P2- und P3-Puffer wie oben beschrieben. Der resultierende Überstand der Zentrifugation wurde auf eine mit 5 mL QBT-Puffer äquilibrierte *Qiagen* tip-100-Anionenaustauschersäule aufgetragen und diese nachfolgend zweimal mit jeweils 5 mL QC-Puffer gewaschen. Durch die Zugabe von 5 mL QF-Puffer wurde die Plasmid-DNA eluiert, mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und das resultierende Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen konnte das Plasmidpellet in einem geeigneten Volumen Tris-Puffer aufgenommen werden.

P1-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg·mL ⁻¹

P2-Puffer	NaOH	200	mM
	SDS	1	% (w/v)
P3-Puffer	KOAc pH 4,8	2,55	M
QBT-Puffer	NaCl	750	mM
	MOPS	50	mM
	EtOH pH 7,0	15	% (v/v)
	Triton X-100	0,15	% (v/v)
QC-Puffer	NaCl	1	M
	MOPS	50	mM
	EtOH pH 7,0	15	% (v/v)
QF-Puffer	NaCl	1,2	M
	MOPS	50	mM
	EtOH pH 8,0	15	% (v/v)
Tris-Puffer	Tris/HCl pH 8,5	10	mM

4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *Bacillus*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *Bacillus* erfolgte nach der 'rapid boiling method', bei der durch das Kochen in Anwesenheit von Detergenzien alle Zellbestandteile, mit Ausnahme der Plasmid-DNA, denaturiert werden [Holmes *et al.*, 1981].

Die *Bacillus*-Zellen einer 5 mL üN-Kultur (2x YT) wurden für 5 min abzentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und RT) und in 350 µL STET-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 25 µL Lysozym Lösung (20 mg·mL⁻¹) wurde erst 30 min bei 37°C und dann 90 s im kochenden Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Lösung im Eisbad auf 0°C abgekühlt, mit 100 µL eines Isoamylalkohol-/Chloroform-Gemisches (1:24) versetzt, kurz vortexiert und 10 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und RT). Die wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und 10 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und RT). Das resultierende Pellet wurde in 200 µL TE/NaCl-Puffer resuspendiert, mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in Tris-Puffer aufgenommen.

STET-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	50	mM
	EDTA	50	mM
	Saccharose	8	% (w/v)
	Triton X-100	5	% (v/v)
TE/NaCl	Tris/HCl pH 8,0	10	mM
	EDTA	1	mM
	NaCl	300	mM

4.1.3 Präparation chromosomaler DNA aus *B. licheniformis*

4.1.3.1 Präparation über eine Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Präparation hochmolekularer chr. DNA wurden die Zellen einer 200 mL *B. licheniformis* üN-Kultur (2xYT) 10 min abzentrifugiert (7.000 U·min⁻¹ und 4°C), das Zellpellet in 20 mL L-Puffer resuspendiert und unter ständigem Rühren bis zur beginnenden Lyse bei 30°C inkubiert. Nachfolgend wurde in einem Eisbad gekühlt, mit 10 mL SDS-Puffer versetzt und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde unter vorsichtigem Rühren mit 2 mg Proteinase K

gemixt, für 40 min bei 40°C inkubiert und anschließend mit einem Volumen Tris-SDS-gesättigtem Phenol vermischt. Nach 10 min Zentrifugation (2.000 U·min⁻¹ und 4°C) wurde die obere wäßrige Phase mit einer weitporigen Pipette abgenommen, zur Entfernung von Phenolresten mit einem Volumen einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (48:2, v/v) extrahiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in einen 100 mL Weithals-Erlenmeyer-Kolben überführt, mit 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 6,0) versetzt und mit 2 Volumen absolutem EtOH (-20°C) überschichtet. Die chromosomalen DNA-Fäden fielen an der Phasengrenze aus und konnten mit Glasstäben aufgewickelt werden. Die gewonnene DNA wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und üN bei RT in einem geeignetem Volumen Tris-Puffer gelöst.

L-Puffer	NaCl pH 8,0	150	mM
	EDTA	100	mM
	Lysozym	1	mg·mL ⁻¹
	RNase A	0,1	mg·mL ⁻¹
SDS-Puffer	Tris/HCl pH 9,0	100	mM
	NaCl	100	mM
	SDS	1	% (w/v)

4.1.3.2 Präparation mit *Qiagen* Anionenaustauschersäulen

Die Zellen einer 25 mL *B. licheniformis* üN-Kultur (2xYT) wurden 10 min abzentrifugiert (7.000 U·min⁻¹ und 4°C) und das Zellpellet in 3,5 mL B1-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde dann mit 80 µL Lysozym-Lösung (100 mg·mL⁻¹) und 100 µL Proteinase K-Lösung (20 mg·mL⁻¹) versetzt und mindestens 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 mL B2-Puffer wurde vorsichtig gemischt und mindestens weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die klare, hochviskose Lösung wurde anschließend mit 1 Volumen QBT-Puffer versetzt, kurz bei maximaler Geschwindigkeit vortexiert und auf eine *Qiagen*-tip-20 Anionenaustauschersäule aufgetragen, welche zuvor zweimal mit 4 mL OBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 7,5 mL QC-Puffer gewaschen und die chr. DNA mit 5 mL QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und anschließende Zentrifugation (30 min, 13.000 U·min⁻¹ und RT) wurde die DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und üN bei RT in einem geeignetem Volumen Tris-Puffer gelöst.

B1-Puffer	Tris/HCl pH 8,5	50	mM
	EDTA	50	mM
	Triton X-100 pH 7,0	0,5	% (v/v)
	Tween-20	0,5	% (v/v)
	RNase A	200	µg·mL ⁻¹
B2-Puffer	GuHCl	3	M
	Tween-20	20	% (v/v)
QBT, QC und QF	vgl. Kapitel 4.1		

4.1.4 Präparation von λ-Phagen-DNA

Die Isolierung der λ-Phagen-DNA erfolgte aus Flüssigkultur-Lysaten. Zur Optimierung der Ausbeute an Phagen wurde zunächst eine analytische Phageninfektion in einer Ver-

dünnungsreihe ausgeführt. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen ($5 \cdot 10^{-1}$ - 10^{-4}) des Phagenstocks in SM-Puffer angefertigt. 1 μL dieser Verdünnungen wurde mit je 50 μL MgSO_4 -*E. coli* XL1-Blue MRA (P2) Zellen (vgl. Kapitel 4.14.5) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 4 mL auf 37°C vorgewärmtem NZY-Medium (10 mM MgSO_4 und 0,2 % (w/v) Maltose) versetzt und bei 37°C im Luftschüttler ($350 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$) inkubiert. Die Verdünnung der Phagen, die nach ca. 16 h Inkubation zu einer vollständigen Lyse der Zellen führte, wurde im folgenden für den präparativen Ansatz verwendet.

625 μL MgSO_4 -*E. coli* XL1-Blue MRA (P2) Zellen wurden mit 12,5 μL der optimalen Phagenverdünnung versetzt, 15 min bei 37°C inkubiert, in 50 mL vorgewärmtes NZY-Medium (10 mM MgSO_4 und 0,2 % (w/v) Maltose) überführt und 16 h bei 37°C im Luftschüttler ($350 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$) inkubiert. Nach erfolgter Lyse wurde zum Abtöten letzter *E. coli* Zellen mit 200 μL Chloroform versetzt und für 15 min unter gleichen Bedingungen weiterinkubiert. Das Zellysate wurde 10 min zentrifugiert ($8.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen, mit 150 μL L1-Puffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die in diesem Puffer enthaltene DNase und RNase wurden die während der Zell-Lyse freigesetzten bakteriellen Nukleinsäuren hydrolysiert, wohingegen die in Phagenköpfe verpackte λ -Phagen-DNA vor dem Angriff der Nukleasen geschützt war. Anschließend wurde mit 10 mL L2-Puffer versetzt und die Phagenpartikel üN bei 0°C präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation ($10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C) wurde das Phagenpellet in 3 mL L3-Puffer resuspendiert, mit 3 mL L4-Puffer versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde 10 min auf Eis gekühlt, mit 3 mL eiskaltem L5-Puffer gemischt und 30 min zentrifugiert ($10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C). Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, die gefällte Phagen-DNA durch 30 min Zentrifugation ($13.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und RT) präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 μL Tris-Puffer gelöst.

L1-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	100	mM
	NaCl	300	mM
	BSA	0,2	mg·mL ⁻¹
	RNase A	20	mg·mL ⁻¹
	DNase I	6	mg·mL ⁻¹
L2-Puffer	PEG-6000	30	% (w/v)
	NaCl	3	M
L3-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	100	mM
	NaCl	100	mM
	EDTA	25	mM
L4-Puffer	SDS	4	% (w/v)
L5-Puffer	KOAc pH 4,88	2,55	M
SM-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	50	mM
	NaCl	100	mM
	MgSO_4	5	mM
	Gelatine	0,01	% (w/v)

4.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Proben wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine Absorption von 1,0 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Üblicherweise wurde eine 1:200 Verdünnung der DNA-Lösung in H_2O gemessen, so daß sich die Konzentration der DNA folgendermaßen berechnen läßt:

$$c_{\text{dsDNA}}[\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}] = \text{OD}_{260} \cdot 200 \cdot 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$$

4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet [Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987]. Hierbei wird doppelsträngige Matrizen-DNA zunächst durch Erhitzen auf 94°C in die Einzelstränge überführt. Zwei synthetische Oligonukleotide, die zu den 3' -Enden beider DNA-Stränge des jeweils zu amplifizierenden DNA-Abschnitts komplementär sind, werden in großem Überschuß zu der denaturierten DNA gegeben und die Temperatur auf $50\text{-}60^\circ\text{C}$ gesenkt. Dabei bleibt die Matrizen-DNA denaturiert, weil die komplementären Stränge in einer zu geringen Konzentration vorliegen, um während der Inkubationsdauer aufeinanderzutreffen. Die spezifischen Oligonukleotide jedoch, die in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, hybridisieren mit ihren komplementären Sequenzen in der Matrizen-DNA. Die Oligonukleotide dienen nun in Gegenwart einer temperaturresistenten DNA-Polymerase als Primer für die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Das Enzym kann die Primer bei einer optimalen Temperatur von 68°C effizient in 3' -Richtung verlängern. Nach Beendigung der Synthese wird das gesamte Gemisch erneut auf 94°C erhitzt, um die gerade gebildeten DNA-Doppelstränge zu schmelzen. Wird die Temperatur wieder verringert, so findet eine neue Syntheserunde statt, da die Oligonukleotide noch immer in großem Überschuß vorhanden sind. In wiederholten Zyklen von Hybridisierung der Primer ($50\text{-}60^\circ\text{C}$), DNA-Synthese (68°C) und Schmelzen (94°C) wird die gewünschte Sequenz amplifiziert. In jeder Runde wird die Anzahl der Kopien von der zwischen den Primern synthetisierten Sequenz verdoppelt. Somit können theoretisch in n Zyklen bis zu 2^n Kopien des doppelsträngigen DNA-Fragmentes produziert werden.

In der vorliegenden Arbeit kamen die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* sowie die rekombinante *Pwo*-DNA-Polymerase aus dem hyperthermophilen, marinen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* zum Einsatz. Die *Pwo*-DNA-Polymerase besitzt neben einer hohen $5' \rightarrow 3'$ -Polymerase-Aktivität auch eine $3' \rightarrow 5'$ -"Korrektur"-Exonuklease-Aktivität, die im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase eine etwa zwölfmal höhere Synthesegenauigkeit (ungefähr ein Fehler auf 10^6 Basen) besitzt. Dies ist insbesondere bei der Amplifikation größerer DNA-Fragmente von Vorteil.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nicht nur zur Amplifikation, sondern auch zur terminalen Modifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Hierzu wurden 5' -modifizierte Oligonukleotide eingesetzt, die die gezielte Einführung terminaler Restriktionsschnittstellen in die amplifizierten DNA-Fragmente ermöglichte. Die Oligonukleotide hybridisierten während der ersten Zyklen nur unvollständig mit ihren komplementären 3' -Enden an die Matrize. Durch die Synthese der Gegenstränge wurden die terminalen Schnittsequenzen

jedoch Bestandteil der Matrize, so daß die Startermoleküle in den folgenden Zyklen der PCR vollständig an die neu-synthetisierten Matrizen hybridisierten. Aus den genannten Gründen wurde eine mehrstufige Technik zur Amplifikation definierter DNA-Regionen mit neu zu generierenden terminalen Schnittsequenzen eingesetzt. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide in den ersten fünf Zyklen der PCR wurden so gewählt, daß nur die sich tatsächlich anlagernden Basen berücksichtigt wurden. Die Hybridisierungstemperatur ($T_{Hyb.}$) wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$T_{Hyb.} = [4 \cdot \Sigma(G+C)] + [2 \cdot \Sigma(A+T)] \text{ in } ^\circ\text{C}$$

Im folgenden sind die typischen Temperaturzyklen einer PCR zur Amplifikation eines DNA-Fragments aufgeführt, bei dem terminale Schnittstellen eingeführt werden:

	94°C	2 min
5 Zyklen	94°C	1 min
	x°C (mit x = 45-55°C)	1 min
	68°C	40 s/kb
10 Zyklen	94°C	1 min
	y°C (mit y = 50-60°C)	1 min
	68°C	40 s/kb
20 Zyklen	94°C	1 min
	y°C (mit x = 50-60°C)	1 min
	68°C	40 s/kb + 20s/Zyklus

Die PCR wurde mit dem Expand™ Long Range PCR Kit (*Boehringer Mannheim*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der in diesem Kit enthaltene DNA-Polymerase-Mix enthält ein Gemisch der schnellen *Taq*-Polymerase und der fehlerkorrigierenden *Pwo*-Polymerase. Als DNA-Matrize dienten entweder Plasmid-DNA oder chromosomale DNA von *B. licheniformis*. Für einen PCR-Ansatz (50 µL) wurden 25 µL Mix I und 25 µL Mix II unmittelbar vor dem Reaktionsbeginn gemischt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Reaktion wurde im Thermal Cycler 480 (*Perkin Elmer*) durchgeführt.

Mix I	DNA-Matrize	0,1-10	ng
	5' -Oligonukleotid (5 pmol/µL-1)	3,0	µL
	3' -Oligonukleotid (5 pmol/µL-1)	3,0	µL
	dNTPs (10 mM)	1,75	µL
	ad H2O	25,0	µL
Mix II	Puffer 3	5,0	µL
	DNA-Polymerase-Mix	0,75	µL
	ad H2O	25,0	µL
Puffer 3	Tris/HCl pH 9,2	500	mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	160	mM
	MgCl ₂	22,5	mM
	DMSO	20	% (v/v)
	Tween-20	1	% (v/v)

4.2.1 Phosphorylieren von DNA-Fragmenten

Die für die ortsspezifische Fusion von Domänenfragmenten verwendeten Oligonukleotide mußten mit einer 5' -Phosphatgruppe versehen werden, damit bei der anschließenden Ligation der polymerisierten DNA-Stränge Phosphordiesterbindungen geknüpft werden konnten. Das

5' -Hydroxy-Ende des synthetischen Oligonukleotides wurde mit der T4-Polynukleotid-Kinase unter Verbrauch von ATP phosphoryliert. Hierzu wurden 50 pmol des Oligonukleotides, 3 μL einer 10 mM ATP-Lösung, 3 μL des 10x PNK-Puffer und 1 μL T4-Polynukleotid-Kinase (4 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) in einem Endvolumen von 30 μL gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert. Die so phosphorylierten Oligonukleotide konnten bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt werden und wurden ohne weitere Aufarbeitung für die PCR eingesetzt.

10x PNK-Puffer	Tris/HCl pH 7,6	500	mM
	MgCl ₂	100	mM
	β -Mercaptoethanol	10	mM

4.2.2 Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen

Die Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen erfolgte mit dem QIAquick-spin PCR purification Kit (*Qiagen*) und ermöglichte die Abtrennung von Oligonukleotiden, Nukleotiden, Enzymen und Mineralöl. Das Prinzip der Reinigung geht auf eine von Vogelstein beschriebene Methode zurück [Vogelstein *et al.*, 1979] und beruht auf der unter Hochsalzbedingungen erfolgenden Fällung von DNA an Silicagel. Die hohe Konzentration an chaotropen Salzen (z. B. GuHCl oder Perchlorat) bewirkt eine Veränderung der Struktur des Wassers und zwingt die DNA durch den Entzug der Wassermoleküle an der Oberfläche des Silicagels zu präzipitieren [Hamaguchi *et al.*, 1962]. Die auf der Matrix befindliche DNA wird nachfolgend mit einer ethanolischen Lösung gewaschen, ehe sie mit Tris-Puffer rehydratisiert und hierdurch vom Silicagel eluiert werden kann. Die exakte Zusammensetzung der benötigten Puffer wurde vom Hersteller nicht angegeben.

Der Reaktionsansatz wurde mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt, durchmischt, auf eine QIAquick-spin-Säule aufgetragen und für 45 s zentrifugiert (6.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$). Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 750 μL PE-Puffer versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Durch eine erneute Zentrifugation (13.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$) wurden letzte Reste an Waschpuffer entfernt. Abschließend konnte die DNA durch die Zugabe von 50 μL Tris-Puffer und 45 s Zentrifugation (13.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$) eluiert werden.

4.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR-Script-Vektor

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden entweder über die endständig erzeugten Schnittstellen (vgl. Kapitel 4.2) oder mit Hilfe des pCR-Script SK(+) Cloning Kit (*Stratagene*) kloniert. Diese Methode beruht auf der simultanen Reaktion von T4-DNA-Ligase und der Restriktionsendonuklease *Srf* I. Dieses selten schneidende Restriktionsenzym erkennt eine Oktanukleotidsequenz (5' -GCCCCGGGC-3'), die im pCR-Script Vektor einmal vorkommt und glatte DNA-Enden erzeugt. Für den Klonierungsansatz wurde ein zunächst an den Enden geglättetes und über ein Agarosegel aufgereinigtes PCR-Fragment eingesetzt (vgl. Kapitel 4.4 und 4.6.1), welches zusammen mit dem Restriktionsenzym *Srf* I, der T4-DNA-Ligase und dem *Srf* I geschnittenem Vektor üN bei RT inkubiert wurde. Dies hatte zur Folge, daß bei einer Religation des Vektors sofort eine hydrolytische Spaltung durch *Srf* I erfolgte und somit das geschnittene Phagemid erneut zur Ligation mit dem PCR-Fragment zur Verfügung stand. Dagegen wurde bei einer Ligation des Vektors mit dem PCR-Fragment die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Srf* I zerstört und es konnte keine Spaltung

mehr stattfinden, was das Gleichgewicht auf die Seite des klonierten PCR-Fragmentes verschob.

Klonierungsansatz	PCR-Fragment	~ 20	ng
	pCR-Script-Vektor (10 ng·µL ⁻¹)	1	µL
	10x Reaktionspuffer	1	µL
	rATP (10 mM)	0,5	µL
	T4-DNA-Ligase (1 U·µL ⁻¹)	1	µL
	Srf I (5 U·µL ⁻¹)	1	µL
	ad H ₂ O	10	µL
10x Reaktions-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	250	mM
	MgCl ₂	100	mM
	DTT	100	mM
	BSA	200	µg·mL ⁻¹

4.3 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von chr. DNA und Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese aus verschiedenen Bakterienstämmen gewonnenen Enzyme erkennen vorwiegend Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen, die eine zweizählige Symmetrie besitzen, sogenannte Palindrome. Die hydrolytische Spaltung der beiden DNA-Stränge erfolgt dabei innerhalb der Erkennungssequenz. Je nach verwendetem Enzym können dabei glatte (*blunt ends*) oder, bei versetzter Spaltung, einzelsträngige 3' - bzw. 5' - Enden (*sticky ends*) entstehen. Das 3' -Ende trägt immer eine Hydroxyl- und das 5' -Ende eine Phosphatgruppe. Der für eine hydrolytische Spaltung verwendete Restriktionspuffer (L-, M- oder H-Puffer) und die gewählte Inkubationstemperatur (RT, 30 oder 37 °C) variierten in Abhängigkeit des Enzyms. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 h wurden die DNA-Fragmente über eine Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.6) aufgetrennt und die Vollständigkeit der Restriktion kontrolliert. Die Menge der eingesetzten Restriktionsendonuklease ergab sich aus der Definition der Enzymaktivität: 1 U eines Enzyms schneidet 1 µg λ-DNA bei 37°C innerhalb 1 h vollständig.

L-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	100	mM
	MgCl ₂	100	mM
	DTT	10	mM
M-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	100	mM
	MgCl ₂	100	mM
	NaCl	500	mM
	DTT	10	mM
H-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	100	mM
	MgCl ₂	100	mM
	NaCl	1000	mM
	DTT	10	mM

4.4 Glätten von überstehenden DNA-Enden

Für einige Klonierungen, wie z. B. von PCR-Fragmenten in den pCR-Script-Vektor, war es nötig, überstehende einzelsträngige DNA-Enden zu glätten (*blunten*). Mit Hilfe der T4-DNA-

Polymerase konnten sowohl 3' -, als auch 5' -überstehende Enden geglättet werden [Sambrook *et al.*, 1989]. Dies war möglich, da dieses Enzym in Abwesenheit von Desoxynukleotiden eine 3'→5' -Exonukleaseaktivität und in Gegenwart von Desoxynukleotiden eine 5'→3' -Polymeraseaktivität besitzt.

5' -überstehende Enden eines DNA-Fragmentes wurden aufgefüllt, indem dieses Fragment nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Polymerase, 0,1 Volumen 10x T4-DNA-Polymerase-Puffer und 1 µL dNTP-Mix (je 2 mM) für 15 min bei 37 °C inkubiert wurde. Zum Glätten von 3' -überstehenden Enden wurde das Fragment 15 min bei RT mit 1 U T4-DNA-Polymerase und 0,1 Volumen 10x T4-DNA-Polymerase-Puffer inkubiert. Um hierdurch eventuell entstandene 5' -überstehende Enden aufzufüllen, wurde anschließend 1 µL dNTP-Mix (je 2 mM) hinzugegeben und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert.

10x T4-DNA-Polymerase- Puffer	Tris/HOAc pH 7,9	330	mM
	KOAc	660	mM
	Mg(OAc) ₂	100	mM
	DTT	5	mM
	BSA	1	mg·mL ⁻¹

4.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der hydrolytischen Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen entstehen 5' -Phosphatenden, die durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) hydrolysiert werden können. Die von der T4-DNA-Ligase katalysierte Ligation, das Knüpfen einer Phosphordiesterbindung zwischen dem 5' -Phosphat- und dem 3' -Hydroxyl-Ende von DNA-Fragmenten (vgl. Kapitel 4.7), kann beim Verwenden eines dephosphorylierten Vektors nur noch zwischen dem Vektor und der angebotenen Fremd-DNA stattfinden, eine Religation des Vektors ist nicht mehr möglich.

Die Dephosphorylierung wurde nach vollständiger hydrolytischer Spaltung und Aufreinigung der DNA (vgl. Kapitel 4.2.2) durch Versetzen mit 0,1 Volumen 10x CIP-Puffer, 1 U CIP und 60 min Inkubation bei 37°C durchgeführt.

10x CIP-Puffer	Tris/HCl pH 9,0	500	mM
	MgCl ₂	10	mM
	ZnCl ₂	1	mM
	Spermidin	10	mM

4.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe können in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches sich zwischen GC-Basenpaaren einlagert und mit der DNA einen Komplex bildet, können diese Fragmente sichtbar gemacht werden [Sharp *et al.*, 1973].

Üblicherweise wurden 0,8 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung dieser Gele wurde die Agarose mit TB-Gelpuffer versetzt, bis zum Sieden erhitzt und langsam auf ca. 50°C abgekühlt. Nun konnte die Agaroselösung in eine geeignete Flachbett-Apparatur gegossen werden. In dieser Elektrophoresekammer war zuvor ein 17-zähliger Probenkamm befestigt worden, dessen 4 mm breite Zähne den Boden der Kammer nicht berührten. Kleine Elektrophoresekammern (9,5 x 14 cm²) wurden mit 50 mL und große

Elektrophoresekammern ($14 \times 14 \text{ cm}^2$) mit 75 mL Agaroselösung gefüllt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TB-Laufpuffer überschichtet und der Probenkamm vorsichtig herausgezogen, wodurch Taschen entstanden, die maximal 20 μL Probenlösung aufnehmen konnten. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese im Verhältnis 5:1 mit 6x Probenpuffer versetzt. Dieser Puffer erhöhte die Dichte der DNA-Lösung, so daß diese problemlos in die Probestasche pipettiert werden konnte. Ferner enthielt er Farbstoffe, die es erlaubten den Verlauf der Elektrophorese abzuschätzen. Bei den Farbstoffen handelte es sich um Bromphenolblau und Xylen-Cyanol, deren elektrophoretische Beweglichkeit der von DNA-Fragmenten einer Länge von 300 bzw. 4000 bp vergleichbar ist [Sambrook *et al.*, 1989]. Als Größenstandard diente *Hind* III geschnittene λ -DNA, die Fragmente in einem Bereich von 0,125 bis 23 kb lieferte.

Die Elektrophorese wurde bei einer Leistung von ca. 20 W (100 mA/ ca. 200 V) durchgeführt, wobei die DNA-Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Größe aufgetrennt wurden [Maniatis *et al.*, 1975]. Nach Abschluß der Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente unter kurzwelligem Licht (312 nm) identifiziert werden, da die angeregten DNA-EtBr-Komplexe im orangeroten Bereich (590 nm) des sichtbaren Lichtes fluoreszieren. Die Gele wurden zur Dokumentation unter Verwendung eines Orangefilters mit Hilfe einer Videokamera fotografiert. Die Ausgabe der Bilder erfolgte mit Hilfe eines Videodruckers (*Mitsubishi*) auf Thermopapier.

TB-Gelpuffer	Tris-Base	90	mM
	Borsäure	90	mM
	EtBr 1 %ige Lösung (w/v)	0,04	‰ (v/v)
TB-Laufpuffer	Tris-Base	90	mM
	Borsäure	90	mM
6x Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
	Xylen Cyanol	0,25	% (w/v)
	Ficoll 400	15	% (w/v)

4.6.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Sehr große DNA-Fragmente, wie z. B. chr. DNA, können durch konventionelle Gelelektrophorese nicht effektiv getrennt werden. Durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) kann jedoch DNA bis zu einer Größe von 10 Millionen Basenpaaren aufgetrennt werden [Cantor *et al.*, 1988]. Bei dieser Methode wird die Richtung des elektrischen Feldes ständig abrupt geändert, was eine Umoorientierung der Längsachse der DNA-Moleküle bewirkt, bevor sie ihren Weg durch das Gel in Richtung des neuen Feldes fortsetzen können. Die Zeit für diese Umoorientierung nimmt mit der Größe der DNA zu. Durch geeignete Wahl der Pulsdauer wandern kürzere DNA-Fragmente schneller durch das Gel als längere, so daß eine effektivere Trennung als bei einer Elektrophorese mit Gleichstrom erreicht werden kann [Anand, 1988].

Die PFGE wurde in der Elektrophoresekammer HE SuperSubTM Horizontal Unit (*Hoefer Scientific Instruments*) durchgeführt. Diese Apparatur besteht aus einer UV-durchlässigen Gelkammer ($20 \times 25 \text{ cm}^2$), welche in eine Elektrophoresekammer mit einem Pufferreservoir eingesetzt wird. Zur Vermeidung von Überhitzung sind sowohl das Gelbett als auch das Pufferreservoir über eine Wasserkühlung temperierbar. Ferner kann über eine integrierte

Rührvorrichtung der Laufpuffer während der Elektrophorese ständig umgewälzt werden, was zu einer gleichmäßigen Temperaturverteilung in der gesamten Apparatur führt.

250 mL EtBr-haltiger TBE-Gelpuffer wurde mit Agarose (0,8 % (w/v)) versetzt und bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf 50°C wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen, in der zuvor ein 20-zähliger Probenkamm befestigt worden war. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit ca. 1000 mL TBE-Laufpuffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Die hierdurch entstandenen Probestaschen konnten ein Volumen von bis zu 25 µL aufnehmen. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 (v:v) mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Probestaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde MidRange PFG Marker I (*New England Biolabs*) eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde unter Verwendung eines Pulsfeldgenerators Switchback™ Pulse Controller (*Hoefer Scientific Instruments*) bei einer konstanten Spannung von 200 V mit folgenden Parametern durchgeführt: 10 min Einlaufzeit ohne Puls, 16 h Laufzeit, Pulsdauer 1 → 30 s und Pulsrate 3:1.

0,5x TBE-Gelpuffer	Tris-Base	45	mM
	Borsäure	45	mM
	EDTA	1	mM
	EtBr 1 %ige Lösung (w/v)	0,04	‰ (v/v)
0,5x TBE-Laufpuffer	Tris-Base	45	mM
	Borsäure	45	mM
	EDTA	1	mM

4.6.2 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei einer Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nicht nur nach ihrer Größe aufgetrennt, sondern auch von Protein- und Enzymbestandteilen, sowie von hohen Salzkonzentrationen aus vorhergehenden Reaktionsansätzen befreit. Dies kann für nachfolgende Modifizierungen wie Ligationen oder radioaktive Markierungen von Bedeutung sein (vgl. Kapitel 4.7 und 4.11). Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurde der JETSORB-Kit verwendet. Diese Methode beruht auf der Präzipitation von DNA an Silicagel unter Hochsalzbedingungen (vgl. Kapitel 4.2.2).

Das betreffende DNA-Fragment wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht, die zu präparierende Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und nach Zerkleinern des Gelstückes in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Visualisierung der DNA wurde weniger energiereiches langwelliges UV-Licht (365 nm) benutzt, um Doppelstrang-Brüche der DNA zu verhindern. Pro 100 mg Gelstück wurde dieses mit 300 µL (jedoch max. 900 µL) A1-Puffer und -unabhängig von der Menge des Agarosestückes - mit 10 µL JETSORB-Suspension versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 50°C hatte sich das Gelstück aufgelöst und die DNA war an das in der JETSORB-Suspension befindliche Silicagel gebunden worden. Um ein Absetzen der Suspension zu verhindern, wurde das Reaktionsgefäß während dieser Zeit fünfmal durchmischt. Anschließend wurde das Silicagel durch 30 s Zentrifugation (13.000 U·min⁻¹) pelletiert und mit 300 µL A1-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Pellet dann zur weiteren Reinigung in 300 µL A2-Puffer suspendiert werden. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bevor der Überstand nach einer weiteren Zentrifugation komplett entfernt

und das Pellet bei 37°C getrocknet wurde. Die DNA wurde aus dem JETSORB-Material durch Suspension desselben in 20 µL Tris-Puffer und 5 min Inkubation bei 50°C herausgelöst. Nach 1 min Zentrifugation (13.000 U·min⁻¹) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

JETSORB-Susp.	JETSORB-Matrix		
	EtOH	30	% (v/v)
	EDTA	1	mM
	Tris/HCl pH 6,0	10	mM
A1-Puffer	NaClO ₄	7	M
	Sorbit	66	mM
	NaOAc pH 5,1	30	mM
A2-Puffer	EtOH	70	% (v/v)
	EDTA	1	mM
	Tris/HCl pH 7,5	10	mM

4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit dephosphorylierter Vektor-DNA wurde mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3' -Hydroxyl- und 5' -Phosphatgruppen [Sambrook *et al.*, 1989]. Zur Ligation wurde Vektor-DNA mit Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 - 1:5 gemischt, 1 U T4-DNA-Ligase, 0,2 Volumen 5x Ligationspuffer zugesetzt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 15 µL aufgefüllt. Im Falle einer Ligation überstehender einzelsträngiger Enden (*sticky ends*) erfolgte eine Inkubation bei 16°C für mindestens 12 h, während bei einer Verknüpfung glatter Enden (*blunt ends*) 4 h bei RT inkubiert wurde.

Aufgrund der hohen Ionenstärke konnten etwa nur 0,1 Volumen eines Ligationsansatzes für eine Elektroporation eingesetzt werden (vgl. Kapitel 4.9.2). Um die Ausbeute an Transformanten zu erhöhen, wurde in einigen Fällen eine 'Tröpfchendiffusion' durchgeführt. Hierzu wurde ein Filterplättchen (*Millipore*, Filtertyp VS, Porengröße 0,025 µm und Ø 47 mm) vorsichtig in einer Petrischale auf die Oberfläche von sterilem H₂O gelegt und der Ligationsansatz auf die schwimmende Membran pipettiert. Während einer Inkubation von 2 h bei RT konnten kleine, geladene Moleküle durch das Filterplättchen in das Wasserreservoir diffundieren, wohingegen die DNA auf der Filteroberfläche zurückgehalten wurde. Der so erhaltene salzfreie Ligationsansatz konnte nun komplett für eine Elektrotransformation eingesetzt werden.

5x Ligationspuffer	Tris/HCl pH 7,6	250	mM
	MgCl ₂	50	mM
	ATP	5	mM
	DTT	5	mM
	PEG	25	% (w/v)

4.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Mit Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit von Zellen, Fremd-DNA aufzunehmen. Bei *E. coli* kann dieser Zustand künstlich durch Behandlung mit CaCl_2 oder RbCl induziert werden [Dagert *et al.*, 1979].

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden zunächst je nach Methode 50-400 mL 2xYT-Medium in einem Verhältnis 1:100 mit einer *E. coli* üN-Kultur angeimpft und bei 37°C und 250 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ bis zum Erreichen einer OD_{600} von ~0,5 (mittlere exponentielle Wachstumsphase) in einem Luftschüttler angezogen.

4.8.1 CaCl_2 -kompetente *E. coli* Zellen

Je 10 mL Kulturflüssigkeit wurden in vier sterile 10 mL Reagenzgläser überführt und 10 min zentrifugiert (4.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C). Das Zellpellet wurde in je 5 mL steriler, kalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30 min bei 0°C inkubiert. Nun wurde erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 1 mL CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Die so behandelten Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei 4°C gelagert werden, wobei sie nach 24 h die höchste Kompetenz ausbildeten.

4.8.2 RbCl -kompetente *E. coli* Zellen

Die Zellkultur wurde in 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt und 5 min zentrifugiert (4.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C). Die Zellpellets wurden in je 15 mL eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min bei 0°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C) wurden die Zellen in je 2 mL TFB2-Puffer suspendiert und direkt zur Transformation eingesetzt oder in 200 μL Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

TFB1-Puffer (pH 5,8; sterilfiltriert)	RbCl	100	mM
	MnCl ₂	50	mM
	KOAc	30	mM
	CaCl_2	10	mM
	Glycerin	15	% (v/v)
TFB2-Puffer (pH 8,0; autoklaviert)	MOPS	10	mM
	RbCl	10	mM
	CaCl_2	75	mM
	Glycerin	15	% (v/v)

4.8.3 Elektrokompente *E. coli* Zellen

Die Zellkultur wurde auf 0°C abgekühlt in 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt und 5 min zentrifugiert (4.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C). Die Zellpellets wurden dreimal in eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert (1 Volumen → 0,5 Volumen → 0,02 Volumen) und wie oben beschrieben zentrifugiert. Schließlich wurde in 0,002 Volumen 10 % iger Glycerin-Lösung aufgenommen, in 40 μL Aliquots aufgeteilt, bei -196°C schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.9 Transformation von *E. coli* Zellen

Zur Transformation von Plasmiden wurden CaCl_2 - oder RbCl -kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt, wohingegen Ligationsansätze durch Elektroporation in elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert wurden.

4.9.1 Transformation CaCl_2 und RbCl kompetenter *E. coli* Zellen

Es wurden 200 μL kompetente *E. coli* Zellen mit maximal 20 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 2 min eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C , während der die angebotene DNA von den Zellen aufgenommen wurde. Zu diesem Transformationsansatz gab man 1 mL 2xYT-Medium und inkubierte 1 h bei 37°C . In dieser Zeit konnte sich die von der Fremd-DNA kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden. Daraufhin konnte der Ansatz auf 2xYT-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert werden. Bei einer Inkubation üN bei 37°C konnten nur die Zellen wachsen, die die Fremd-DNA aufgenommen hatten.

4.9.2 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation elektrokompenter Zellen wird ein Gemisch aus Zellen und Plasmid-DNA kurzzeitig elektrischen Spannungen ausgesetzt. Da starke elektrische Felder Membranen vorübergehend für große Moleküle passierbar machen, können die Plasmid-DNA-Moleküle in die Zelle eindringen [Dower *et al.*, 1988; Taketo, 1988].

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit maximal 1,5 μL eines nicht dialysierten bzw. dem gesamten Volumen eines zuvor dialysierten Ligationsansatzes (vgl. Kapitel 4.7) versetzt und in gekühlte Elektrotransformationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Gene-Pulser II (*Biorad*) bei einer Spannung von 2,5 kV (elektrische Feldstärke $12,5 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$), 200 Ω Widerstand und 5 μF Kondensatorkapazität durchgeführt. Sofort nach der Entladung des Kondensators wurden die Zellen mit 1 mL 2xYT-Medium versetzt, in ein 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37°C in einem Luftschüttler ($250 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$) inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen einerseits die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz ausbilden und andererseits ihre durch die Transformation geschädigten Zellwände und -membranen regenerieren. Anschließend wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

4.10 Herstellung und Transformation kompetenter *B. subtilis* Zellen

Im Gegensatz zu *E. coli* bildet *B. subtilis* den Zustand der Kompetenz natürlich aus [Dubnau, 1989]. Dies geschieht z. B. in Glucose-Minimalmedium beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Die natürliche Kompetenz wurde nach einer modifizierten Methode von Klein induziert [Klein *et al.*, 1992].

Eine Einzelkolonie des zu transformierenden *B. subtilis* JH642 Stammes wurde auf einer TBAB-Platte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Mit einer auf dieser Platte gewachsenen Einzelkolonie wurden 3 mL HS-Medium inokuliert. Nach 16 h Wachstum bei 37°C in einem Roller wurde 1 mL dieser Kultur in 20 mL vorgewärmtes LS-Medium

überführt und 3 h bei 30°C und 100 U·min⁻¹ geschwenkt. 1 mL dieser Kultur wurde mit der zu transformierende DNA gemischt und für 2 h bei 37°C im Roller inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min abzentrifugiert (10.000 U·min⁻¹), in 200 µL des Überstandes resuspendiert und direkt auf Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

TBAB-Agar	NaCl	5,0	g
	Tryptose Blood Agar Base	17,5	g
	Agar Nr. 1	8,0	g
	2 M NaOH	625,0	mL
	ad H ₂ O	1,0	L
10x S-Base	NH ₄ Cl	20,0	g
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	183,0	g
	KH ₂ PO ₄	60,0	g
	Natriumcitrat · 2 H ₂ O	10,0	g
	ad H ₂ O	1,0	L
autoklavieren und vor Benutzung folgende Lösung zusetzen:			
	1 M MgSO ₄	0,1	mL
HS-Medium	10x S-Base	10,0	mL
	50 % (w/v) Glucose	1,0	mL
	Tryptophan (5 mg·mL ⁻¹)	1,0	mL
	Phenylalanin (3 mg·mL ⁻¹)	1,5	mL
	2 % (w/v) Caseinhydrolysat	1,0	mL
	10 % (w/v) Hefeextrakt	1,0	mL
	8 % (w/v) Arginin	10,0	mL
	0,4 % (w/v) Histidin	10,0	mL
	ad H ₂ O	100,0	mL
vor Benutzung autoklavieren			
LS-Medium	10x S-Base	2,0	mL
	50 % (w/v) Glucose	0,2	mL
	Tryptophan (5 mg·mL ⁻¹)	20,0	µL
	Phenylalanin (3 mg·mL ⁻¹)	30,0	µL
	2 % (w/v) Caseinhydrolysat	0,1	mL
	10 % (w/v) Hefeextrakt	0,2	mL
	50 mM Spermin	0,2	mL
	1 M MgCl ₂	50,0	µL
	ad H ₂ O	20,0	mL
direkt vor Gebrauch ansetzen und sterilfiltrieren			

4.11 Markierung von DNA-Fragmenten

Die intramolekulare DNA-Markierung basiert auf einem Verfahren von Feinberg und Vogelstein [Feinberg *et al.*, 1983] und wurde mit dem Rediprime DNA labelling system (Amersham) oder dem ECLTM Random prime labelling system (Amersham) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden dem Reaktionsansatz Hexa- oder Nonanukleotide mit zufälliger Basenfolge zugesetzt, die nach dem Hybridisieren an die DNA-Matrize dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Primer dienen. Ausgehend von diesen Primern werden nun zur DNA-Matrize komplementäre Stränge synthetisiert. Da eines der eingesetzten Desoxynukleotide markiert ist, erfolgt hierdurch eine Markierung des eingesetzten DNA-Fragmentes.

4.11.1 Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung beruht auf einem Einbau von [α - ^{32}P]-dCTP in das zu markierende DNA-Fragment. 2,5-25 ng eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes, das zuvor über ein Agarosegel gereinigt worden war (vgl. Kapitel 4.6.2), wurde mit H_2O auf 49 μL aufgefüllt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nachdem die DNA-Lösung mit dem *Labeling mix* und 1 mCi [α - ^{32}P]-dCTP vermischt worden war, wurde der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 μL 0,2 M EDTA-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und nach erneuter Denaturierung bei 95°C konnte die DNA zur Hybridisierung eingesetzt werden (vgl. Kapitel 4.13.1). Die Sonde konnte ca. 4 Wochen benutzt werden und wurde bei -20°C gelagert.

Der *Labelling mix* enthielt dATP, dGTP, dTTP, Hexanukleotide und Klenow-Polymerase in einer stabilisierten Trockenmatrix ohne Angabe der jeweiligen Konzentrationen durch den Hersteller.

4.11.2 Markierung mit Fluorescein

Bei der Markierung von DNA-Fragmenten durch Fluorescein wird dTTP teilweise durch Fluorescein-11-dUTP (FL-dUTP) ersetzt, was eine spätere Chemilumineszenz-Detektion erlaubt (vgl. Kapitel 4.13.2).

40-80 ng eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes, das zuvor über ein Agarosegel gereinigt worden war (vgl. Kapitel 4.6.2), wurde mit H_2O auf 49 μL aufgefüllt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die DNA mit 10 μL Nukleotid Mix, 5 μL Primer und 1 μL Klenow-Polymerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) versetzt und mindestens 3 h bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde nochmals 5 min bei 95°C denaturiert. Die Sonde konnte bei -20°C gelagert ca. 1 Jahr lang benutzt werden.

Nukleotid Mix	5x Stocklösung von FL-dUTP, dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Tris/HCl (pH 7,8), β -ME und MgCl_2 . Keine Konzentrationsangaben durch den Hersteller
Primer	Zufalls-Nonamere in wässriger Lösung Keine Konzentrationsangaben durch den Hersteller

4.12 Southern-Transfer (*Southern-Blot*)

Die auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA konnte nach einem von Southern beschriebenen Verfahren [Southern, 1975] auf eine Nitrozellulose- bzw. Nylonmembran transferiert werden (*Southern-Blot*). Dazu wurde das Agarosegel zunächst mit einem Größenstandard photographiert und anschließend zur Denaturierung der DNA für 30 min in Southern-Lösung I geschwenkt. Nach Neutralisation des Gels durch 30 min Schütteln in Southern-Lösung II wurde es kurz in 2x SSC gelegt. Für den Transfer der DNA wurden anschließend zwei alternative Verfahren verwendet.

Bei der ersten Methode wurde der Transfer in der Blot-Apparatur Posiblot™ Pressure Blotter & Pressure Control Station (*Stratagene*) durchgeführt. Hierbei wird die DNA mit Hilfe eines durch Luftdruck erzeugten Flüssigkeitsstromes aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurden auf die mit Gaze beschichtete Apparatur zwei in 20x SSC getränkte

3MM-Whatman-Papiere in Gelgröße gelegt, mit einer ebenfalls getränkten Nylonmembran gleicher Größe überschichtet und mit einer Maske abgedichtet. Auf der Maske wurde erst das Gel und dann ein in 20x SSC getränkter Schwamm plaziert. Die Apparatur wurde nun luftdicht verschlossen. Durch einen Druckaufbau von ca. 10 mbar über einen Zeitraum von 30-60 min, wurde die DNA auf die Membran transferiert. Zur Fixierung der DNA wurde die Membran anschließend zweimal für je 45 s im UV-Inkubator Stratalinker® UV Crosslinker Model 1800 (*Stratagene*) belichtet (240 Joule, 254 nm). Bis zur Hybridisierung wurde die Membran, in Folie eingeschweißt, bei 4°C aufbewahrt.

Bei der zweiten Methode wurden die DNA-Fragmente durch Kapillarkräfte aus dem Gel auf die Membran transferiert. Zu diesem Zweck wurde das Gel auf zehn, in Gelgröße zugeschnittene und in 20x SSC getränkte 3MM-Whatmann-Papiere gelegt, von denen das untere in ein 20x SSC Reservoir tauchte. Auf das Gel wurde eine, in 2x SSC getränkte Nitrozellulose- bzw. Nylonmembran gleicher Größe gelegt, die von fünf ebenfalls in 2x SSC getränkten 3MM-Whatmann-Papieren und mehreren Lagen trockenen Zellstoffes überschichtet wurde. Anschließend wurde auf dieser Anordnung eine Glasplatte plaziert und mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Der Transfer der DNA erfolgte üN bei RT. Danach wurde die Membran 5 min in 6x SSC gewaschen und die DNA wie oben beschrieben auf der Membran fixiert.

Southern-Lösung I	NaOH pH 12,3	0,9	M
	NaCl	1,5	M
Southern-Lösung II	Tris/HCl pH 7,5	0,5	M
	NaCl	3	M
20x SSC	NaCl pH 7,0	3	M
	Natriumcitrat	0,3	M

4.13 Southern-Hybridisierung

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten an Nylonmembranen immobilisierte Nukleinsäuren über die Hybridisierung mit einer markierten homologen DNA-Sonde identifiziert werden. Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen richtete sich dabei nach Länge und Homologie der eingesetzten DNA-Sonde.

4.13.1 Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Für eine Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde der Southern-Blot zusammen mit 0,2 mL Prähybridisierungslösung pro cm² Membranfläche in eine Plastikfolie eingeschweißt und ca. 1 h bei 68°C in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben und die Inkubation unter den gleichen Bedingungen üN fortgesetzt. Die Hybridisierungslösung konnte anschließend bei -20°C aufbewahrt werden und stand für weitere Hybridisierungen zur Verfügung. Der Southern-Blot wurde zunächst 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung I geschwenkt, bevor er für 15 min bei 68°C in Waschlösung II gewaschen wurde. Nach dieser Behandlung waren nur noch stringente Hybridisierungen zu beobachten und der Blot konnte, in Frischhaltefolie eingewickelt, in

einer Doppelscreen-Kassette autoradiographiert werden. Die Dauer der Autoradiographie richtete sich nach der Intensität der radioaktiven Strahlung und betrug zwischen 6 und 48 h.

Sollte ein Southern-Blot anschließend für Hybridisierungen mit anderen DNA-Sonden benutzt werden, so wurde die alte Sonde durch 3 h Waschen mit Waschlösung III bei 85°C entfernt. Der Southern-Blot konnte so bis zur nächsten Hybridisierung bei -20°C aufbewahrt werden.

Prähybridisierungslsg.	20x SSC	25	% (v/v)
	Blocking-Reagenz	0,5	% (w/v)
	N-Laurylsarkosin	0,1	% (w/v)
	SDS	0,01	% (w/v)
Waschlösung I	20x SSC	10	% (v/v)
	SDS	0,5	% (w/v)
Waschlösung II	20x SSC	10	% (v/v)
	SDS	0,1	% (w/v)
Waschlösung III	20x SSC	0,5	% (v/v)
	SDS	0,5	% (w/v)

4.13.2 Verwendung Fluorescein markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung und Detektion einer Fluorescein markierten DNA-Sonde erfolgte mit dem ECL™ Random prime labelling and detection system (Amersham). Bei diesem Verfahren wird die Fluorescein markierte DNA-Sonde nach erfolgter Hybridisierung durch einen Fluorescein Antikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist (HRP-Konjugat; *horseradish peroxidase*), erkannt und gebunden. In einem zweiten Reaktionsschritt wird dann mit einer H₂O₂ und Luminol enthaltenden Detektionslösung inkubiert. Dabei wird H₂O₂ als Substrat von HRP reduziert und gleichzeitig Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert wird (vgl. Abbildung 4-1). Bei dieser Redoxreaktion wird Energie in Form von blauem Licht abgegeben, welches auf einem Röntgenfilm durch die Schwärzung des Films detektiert werden kann.

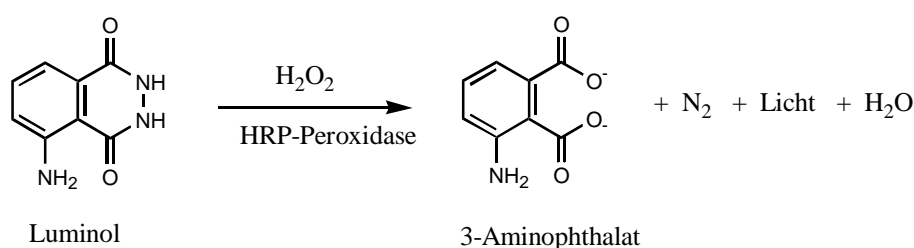


Abbildung 4-1 Lumineszenzreaktion der ECL-Detektion

Für die Hybridisierung wurde der Southern-Blot zusammen mit 0,125 mL Prähybridisierungslösung pro 1 cm² Membranfläche in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und ca. 1 h bei 60°C in einem Hybridisierungsofen (*Bachhofer*) unter ständiger Rotation inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die markierte DNA-Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben und die Inkubation unter den gleichen Bedingungen *üN* fortgesetzt. Die Hybridisierungslösung konnte anschließend bei -20°C aufbewahrt werden und stand für weitere Hybridisierungen zur Verfügung. Der Southern-Blot wurde zunächst 15 min bei 55°C in ECL-Waschlösung I geschwenkt, bevor er für 15 min ebenfalls bei 55°C in ECL-

Waschlösung II gewaschen wurde. Die Membran wurde nun für 1 min in Puffer A gewaschen und dann für 30 min in *blocking*-Lösung geschwenkt (0,2 mL pro 1 cm² Membranfläche). Nachfolgend mußte die Membran für 30 min in Anti-Fluorescein-HRP-Konjugat-Lösung inkubiert (0,125 mL pro 1 cm² Membranfläche) und dann dreimal für je 10 min mit 0,1 % (v/v) TweenTM20 in Puffer A gewaschen werden. Abschließend wurde der Southern-Blot für 1 min mit einer 1:1-Mischung aus Detektionslösung 1 und 2 benetzt, die Oberfläche mit 3 MM-Whatmann-Papier abgetupft, in Frischhaltefolie eingewickelt und in einer Doppelscreen-Kassette autoradiographiert. Nach einer Inkubation von 2-10 min bei RT konnte der Film entwickelt werden.

Sollte ein Southern-Blot anschließend für Hybridisierungen mit anderen DNA-Sonden benutzt werden, so wurde zur Entfernung der alten Sonde 5 min mit 5x SSC gewaschen, mit kochender ECL-Waschlösung III übergossen (5 mL pro 1 cm² Membranfläche), 2 h bei RT abgekühlt und abschließend erneut für 5 min in 5x SSC gewaschen. Der Southern-Blot konnte so bis zur nächsten Hybridisierung bei -20°C aufbewahrt werden.

Prähybridisierungslsg.	Dextransulfat	25	g
	Liquid Block	25	mL
	SDS 20 % (w/v)	2,5	mL
	20x SSC	125	mL
	ad H ₂ O	500	mL
ECL-Waschlösung I	20x SSC	25	mL
	SDS 20 % (w/v)	2,5	mL
	ad H ₂ O	500	mL
ECL-Waschlösung II	20x SSC	12,5	mL
	SDS 20 % (w/v)	2,5	mL
	ad H ₂ O	500	mL
ECL-Waschlösung III	SDS	0,1	% (w/v)
Puffer A	Tris/HCl pH 7,5	100	mM
	NaCl	600	mM
blocking-Lösung	Liquid Block	5	mL
	ad Puffer A	100	mL
Anti-Fluorescein-HRP-Konjugat-Lösung	BSA	250	mg
	HRP-Konjugat	50	µL
	ad Puffer	50	mL

Über die Zusammensetzungen der anderen Lösungen wurden vom Hersteller keine Angaben gemacht

4.14 Konstruktion einer λ-EMBL3 Genbank

Als Genbank bezeichnet man eine Sammlung von rekombinanten DNA-Molekülen in Form von Bakterien-/Plasmidklonen oder Phagenlysaten, deren insertierte Fremd-DNA die gesamte genetische Information eines Organismus repräsentieren. Ein bestimmtes Gen ist mit einer Wahrscheinlichkeit P in einer solchen Genbank vertreten. P ist sowohl von der Größe der Insertion als auch von der Größe des gesamten Genoms abhängig. Bei konstanter Größe der Insertion steigt die Anzahl der benötigten Klone mit zunehmender Genomgröße an. Somit müssen bei größeren Genomen mehr Klone einer bestimmten Größe verwendet werden, um das gesamte Genom zu erfassen. Die Zahl N dieser Klone läßt sich gemäß folgender

Beziehung bestimmen, in welcher P die gewünschte Wahrscheinlichkeit und f das Größenverhältnis der Insertion zum Gesamtgenom darstellt [Clark *et al.*, 1976]:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde der Lambda EMBL3/*Bam*H I Vector Kit (*Stratagene*) gemäß der Herstellerangaben verwendet. Mit diesem Vektor war es möglich hydrolytisch gespaltene DNA-Fragmente (*Sau*3A I, *Mbo* I, *Bgl* II oder *Bam*H I), deren Enden kompatibel zu den mit der Restriktionsendonuklease *Bam*H I geschnittenen Phagen-Armen waren, einer Größe von 9-23 kb zu klonieren. Somit ergab sich unter der Annahme, daß der Klonierungsvektor durchschnittlich 16 kb große DNA-Fragmente aufnahm, für das ca. $4,2 \cdot 10^6$ bp große *Bacillus* Genom bei 1200 voneinander unabhängigen Klonen eine Wahrscheinlichkeit von 99 %, ein gesuchtes Gen zu finden.

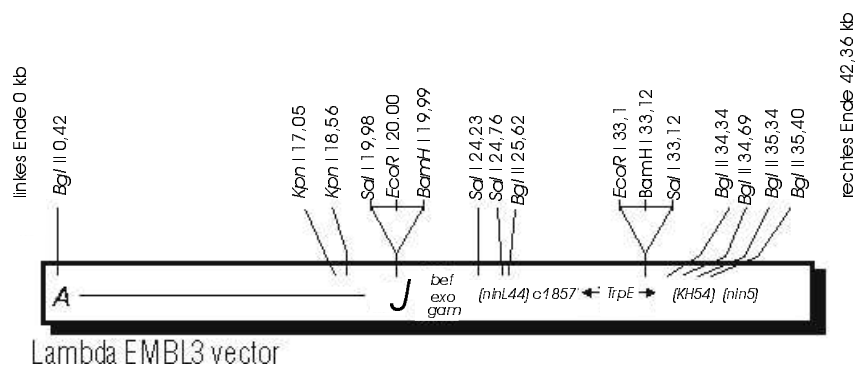


Abbildung 4-2 Physikalische Karte des Lambda EMBL3-Vektors

4.14.1 Partielle hydrolytische Spaltung chromosomaler DNA

Die für die Konstruktion einer Genbank benötigten DNA-Fragmente wurden durch partielle hydrolytische Spaltung chromosomaler DNA mit der Restriktionsendonukleasen *Sau*3A I erzeugt. Dieses Enzym erkennt eine Tetranukleotidsequenz (5' -GATC-3') und schneidet einen DNA-Abschnitt bei gleicher Häufigkeit der vier Nukleotide etwa alle $4^4=256$ Basenpaare. Somit besteht durch partielle Restriktion die Möglichkeit, sich überlappende DNA-Fragmente nahezu beliebiger Größe zu generieren.

Um die Größenverteilung der resultierenden DNA-Fragmente nach erfolgter hydrolytischer Spaltung zu optimieren, wurde zunächst eine Enzymverdünnungsreihe bei konstanter DNA-Menge durchgeführt. Hierzu wurden 50 µg frisch präparierter chr. DNA (vgl. Kapitel 4.1.3.1) in einem Endvolumen von 500 µL 1x Restriktionspuffer (M-Puffer, vgl. Kapitel 4.3) gelöst, auf 10 Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt (Gefäß 1 mit 50 µL und Gefäße 2-10 mit je 25 µL) und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz in Gefäß 1 wurde auf Eis mit 1 µL *Sau*3A I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) versetzt, gemischt und 25 µL dieses Ansatzes in das Reaktionsgefäß 2 transferiert. Aus diesem wurden nach Durchmischung wiederum 25 µL in das dritte Gefäß überführt usw. bis zum neunten Ansatz. Das zehnte Aliquot verblieb als Kontrolle ohne Enzym. Anschließend wurden alle zehn Proben für 60 min bei 37°C inkubiert und die Restriktionsendonuklease durch 15 min Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Jeweils 20 µL dieser Ansätze wurden über PFGE analysiert (vgl. Kapitel 4.6.1).

Der Reaktionsansatz, bei dem DNA-Fragmente von etwa 20 kb entstanden waren, wurde im präparativen Maßstab wiederholt. Dazu wurden 100 µg chr. DNA in einem Gesamtvolumen von 1 mL 1x Restriktionspuffer (M-Puffer) gelöst und mit der ermittelten Konzentration an *Sau3A* I wie zuvor inkubiert. Nach Inaktivierung der Restriktionsendonuklease konnte der Ansatz zur weiteren Größenfraktionierung eingesetzt werden.

4.14.2 DNA-Größenfraktionierung

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten einer möglichst einheitlichen Größe wurden präparative, partielle Restriktionsansätze einer NaCl-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Hierbei macht man sich zunutze, daß die Sedimentationsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen proportional zu ihrer Größe ist [Sambrook *et al.*, 1989].

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden lineare NaCl-Dichtegradienten unter Verwendung von je 5 mL Lösung I und II in Zentrifugenröhrchen (*Beckman*, Poly-Allomer-Tubes 14 x 89 mm) gefüllt und anschließend vorsichtig mit einem präparativen Restriktionsansatz überschichtet. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte durch eine Zentrifugation für 4,5 h bei 37.500 U·min⁻¹ und 4°C (*Beckman* Ultrazentrifuge Spinco L2 65B und *Sorvall* Rotor TH 641). Nachfolgend wurden die Zentrifugenröhrchen unten mit einer Nadel angestochen, der Gradient in 800 µL Fraktionen aufgefangen und einer Tröpfchendialyse unterzogen (vgl. Kapitel 4.7). Die von Salzen befreite DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen NaOAc (pH 7,0) und 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und durch 30 min Zentrifugation (13.000 U·min⁻¹ und RT) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und die DNA in 50 µL Tris-Puffer gelöst. Die Größe der fraktionierten DNA wurde über PFGE (vgl. Kapitel 4.6.1) abgeschätzt.

Lösung I	NaCl	30	% (w/v)
	EDTA pH 8,0	3	mM
Lösung II	NaCl	5	% (w/v)
	EDTA pH 8,0	3	mM

4.14.3 Ligation mit λ-EMBL 3-Armen

Die *Sau3A* I geschnittene und Größen-fraktionierte *Bacillus*-DNA (ca. 20 kb) wurde nach einer Dephosphorylierung (vgl. Kapitel 4.5) in äquimolaren Mengen mit *BamH* I geschnittenen λ-EMBL3-Armen üN bei 4°C ligiert.

Ligationsansatz	λ-EMBL3/ <i>BamH</i> I (1 µg·µL ⁻¹)	1,0	µL
	10x T4-DNA-Ligasepuffer (USB)	0,5	µL
	T4-DNA-Ligase (USB, 10 U·µL ⁻¹)	0,2	µL
	Insert-DNA	~0,4	µg
	ad H ₂ O	5,0	µL

4.14.4 Verpackung in λ-Phagenköpfe

Die Verpackung des Ligationsansatzes in λ-Phagenköpfe wurde mit dem Gigapack[®] III Gold Packaging Extract (*Stratagene*) gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde ein Aliquot des Packaging Extract (25 µL) schnell aufgetaut mit 1 µL des Ligationsansatzes

gemischt und für 105 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 500 μL SM-Puffer (vgl. Kapitel 4.1.4) und 20 μL Chloroform versetzt, gemixt und zur Abtrennung ausgefallener Proteine für 1 min zentrifugiert ($10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 20 μL Chloroform versetzt. Die so erzeugte Genbank konnte bei 4°C gelagert werden.

4.14.5 Präparation von *E. coli* MgSO_4 -Zellen für die λ -Phageninfektion

50 mL 2xYT-Medium (10 mM MgSO_4 und 0,2 % (w/v) Maltose) wurden mit 500 μL einer $\bar{\text{uN}}$ -Kultur *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) angeimpft und bei 37°C im Luftschüttler ($250 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$) bis zum Erreichen einer OD_{600} von 1,0 angezogen. Die Zellen wurden für 10 min abzentrifugiert ($2.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und 4°C) und in 100 mL eiskalter 10 mM MgSO_4 -Lösung resuspendiert. Die so präparierten Zellen konnten bei 0°C gelagert und über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen verwendet werden.

4.14.6 Titration der Genbank

Zur Bestimmung der Verpackungseffizienz wurde der Titer der generierten Genbank ermittelt. Hierzu wurden Verdünnungen der Genbank in SM-Puffer hergestellt und für eine λ -Phageninfektion eingesetzt. Je 1 μL dieser Phagenlösungen wurde mit 200 μL *E. coli* MgSO_4 -Zellen gemischt, für 15 min bei 37°C inkubiert, mit 4 mL 48°C warmen NZY-Topagar gemixt und auf vorgewärmten (37°C) NZY-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation $\bar{\text{uN}}$ bei 37°C konnten die Phagenplaques im *E. coli*-Zellrasen ausgezählt und der Titer der Genbank berechnet werden ($\text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.14.7 Plauefilterhybridisierung – Screening der Genbank

Durch diese Methode war es möglich eine große Anzahl rekombinanter Phagen mit Hilfe einer markierten DNA-Sonde nach einem spezifischen DNA-Abschnitt zu durchmustern. Es wurde wie unter 4.14.6 beschrieben mit einer geeigneten Verdünnung der Genbank eine λ -Phageninfektion durchgeführt, so daß sich nach Inkubation $\bar{\text{uN}}$ bei 37°C ca. 300-400 räumlich voneinander getrennte Plaques auf jeder Infektionsplatte befanden. Auf diese Platten wurde nun eine Hybond- N^+ Nylonmembran (Amersham) gelegt und die relative Position durch randständige asymmetrische Nadelstiche in die Membran und Agarplatten markiert. Nach 10 min Inkubation bei 4°C wurden die Filter mit der Zell-/Plaquesseite nach obenweisend auf eine frische NZY-Agarplatte transferiert und $\bar{\text{uN}}$ bei 37°C inkubiert. Hierdurch wurden die rekombinanten Phagen direkt auf der Nylonmembran amplifiziert, was bei der nachfolgenden Hybridisierung und Detektion zu intensiven Signalen führte, die deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden waren. Die Nylonfilter wurden nun vorsichtig von der Agarplatte abgezogen und nacheinander für 5 min mit 10 %iger SDS-Lösung, 5 min mit Southern I-Lösung und 10 min mit Southern II-Lösung (vgl. Kapitel 4.12) behandelt. Dazu wurden die Membranen mit der nach obenweisenden Zell-/Plaquesseite auf 3MM-Whatmann-Papiere gelegt, welche zuvor mit der jeweiligen Lösung getränkt worden war. Danach wurden die Filter für 1 min auf ein in 2x SSC getränktes Whatmann-Papier gelegt und zur Fixierung der DNA für 1 h bei 80°C gebacken. Zur Entfernung von anheftenden Zellresten wurden die Rundfilter für mindestens 1 h bei 65°C in Waschlösung II geschwenkt und anschließend mit fusselfreien Papiertüchern

abgerieben. Die Hybridisierung erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode der Southern-Hybridisierung (vgl. Kapitel 4.13).

4.14.8 Vereinzelnung positiver λ -Phagen

Zur Isolierung von rekombinanten Phagen, die in einer Plauefilterhybridisierung mit einer DNA-Sonde kreuzreagierten, wurden die zu den Signalen korrespondierenden Plaques mit dem breiten Ende einer sterilen Eppendorf-Pipettenspitze ausgestochen und \approx mit einer Mischung aus 500 μ L SM-Puffer und 20 μ L Chloroform bei 4°C aus dem Agar eluiert. Mit der resultierenden Phagenlösung wurde wie oben beschrieben eine erneute λ -Phageninfektion und Plauefilterhybridisierung durchgeführt. Dieser Vorgang wurde sofort wiederholt bis alle Plaques der Folgeinfektionen ein positives Hybridisierungssignal mit der gegebenen DNA-Sonde lieferten.

4.14.9 Amplifikation positiver Phagen

Für die Lagerung der bis zur Homogenität aufgereinigten λ -Phagen, wurde ein Phagenlysat mit hohem spezifischen Titer ($> 10^6$ pfu·mL⁻¹) erzeugt. Dazu wurde zunächst eine λ -Phageninfektion durchgeführt, wobei das Verhältnis von MgSO₄-*E. coli*-Zellen zu λ -Phagen so gewählt wurde, daß nach einer Inkubation \approx bei 37°C eine vollständige Lyse des Zellrasens eingetreten war. Eine derartige Platte wurde dann mit 5 mL SM-Puffer überschichtet und \approx bei 4°C geschwenkt, wodurch die Phagen in den SM-Puffer eluiert wurden. Am nächsten Tag wurden dann 2 mL abgenommen, mit 20 μ L Chloroform versetzt, zentrifugiert (4.000 U·min⁻¹ und 4°C), in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 20 μ L Chloroform versetzt. Dieses Phagenlysat konnte bei 4°C über Monate hinweg gelagert und zur Präparation von λ -DNA eingesetzt werden (vgl. Kapitel 4.1.4).

4.15 DNA-Sequenzierung

4.15.1 DNA-Sequenzierung mit radioaktiver Markierung

Zur Bestimmung von DNA-Sequenzen wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger *et al.*, 1978] benutzt. Hierbei wurde die zu sequenzierende ssDNA als Matrize mit einer DNA-Polymerase, einem geeigneten Primer, den Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs), von denen dATP radioaktiv markiert war ([³⁵S]-dATP), und dem 2',3' - Dideoxyribonukleotidtriphosphat-Analogon (ddNTP) einer Base inkubiert. Ausgehend von den Primern synthetisierte die DNA-Polymerase einen zur Matrizen-DNA komplementären Strang. Wird hierbei ein ddNTP anstelle eines dNTP in die wachsende Kette eingebaut, so führt dies zum Kettenabbruch, da das ddNTP über keine 3' -Hydroxylgruppe verfügt und somit nicht zur Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbindung befähigt ist. Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen kann statistisch an jeder Base des neu synthetisierten DNA-Stranges ein Abbruch erzeugt werden, so daß ein ganzer Satz von DNA-Fragmenten verschiedener Länge mit einem ddNTP am 3' -Ende erzeugt werden kann. Vier solche Ansätze mit Abbruchfragmenten – einer für jedes Dideoxy-Analogon – werden dann nebeneinander elektrophoretisch auf einem Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt und nach der Autoradio-

graphie kann aus dem sich ergebenden Muster der DNA-Banden die Sequenz der DNA-Matrize abgelesen werden.

Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (*USB*) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

4.15.1.1 Präparation einzelsträngiger Plasmid-DNA

Zur Präparation von ssDNA wurde Plasmid-DNA einer alkalischen Denaturierung unterzogen [Lim *et al.*, 1988]. Hierzu wurde die Plasmid-DNA (ca. 5 µg) mit 0,1 Volumen 2 M NaOH / 2 mM EDTA gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 4,5 - 5,5) neutralisiert, mit 4 Volumen 100 %igem EtOH (-20°C) versetzt und 20 min bei -80°C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation (10.000 U·min⁻¹ und 4°C) wurde das Pellet einmal mit 70 %igem EtOH (-20°C) gewaschen, in einer Speed-Vac getrocknet und in 7 µL H₂O gelöst. Diese Lösung wurde direkt für eine Folgereaktion eingesetzt oder unverzüglich bei -20°C eingefroren, um eine Reassoziaton der DNA-Moleküle zu vermeiden.

4.15.1.2 Hybridisierung des Primers

7 µL ssDNA (1,5-5 µg) wurden mit 2 µL Sequenase-Puffer und 1 µL Primer (0,5-1 pmol) versetzt und 2 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde in ca. 30 min auf RT abgekühlt und bis zum nächsten Reaktionsschritt bei 0°C aufbewahrt.

4.15.1.3 Kettenverlängerung

Es wurden 1 µL 0,1 M DTT, 2 µL verdünnter 1x *labeling mix*, 0,5 µL [α -³⁵S]-dATP und 2 µL Sequenase-Verdünnung (1 µL Sequenase + 0,5 µL Pyrophosphatase + 6,5 µL Sequenase-Verdünnungspuffer) zu dem Hybridisierungsgemisch pipettiert. Die Reaktionsmischung wurde gut durchmischt und 2-5 min bei RT inkubiert.

4.15.1.4 Kettentermination

Es wurden pro Kettenverlängerungsreaktion je vier 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet, in welche je 2,5 µL eines der vier Didesoxy-Terminationsgemische pipettiert wurde. In jedes dieser bei 37°C präinkubierten Reaktionsgefäße wurden nun 3,5 µL eines Kettenverlängerungsansatzes gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 4 µL Stop-Lösung zugegeben und die Proben nach 2 min Denaturierung bei 80°C auf ein Sequenzgel aufgetragen oder aber bei -20°C bis zur Auftragung aufbewahrt.

Sequenase-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	200	mM
	MgCl ₂	100	mM
	NaCl	250	mM
5x labeling mix	dGTP, dCTP, dTTP	je 7,5	µM
ddN-Terminationsmix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 80	µM
	ddNTP	8	µM
	NaCl	50	mM
Sequenase-Verdünnungspuffer	Tris/HCl pH 7,5	10	mM
	DTT	5	mM
	BSA	0,5	mg·mL ⁻¹

Sequenase	Enzym	13	U·μL ⁻¹
	KH ₂ PO ₄ pH 7,4	20	mM
	DTT	1	mM
	EDTA	0,1	mM
	Glyzerin	50	% (v/v)
Pyrophosphatase	Enzym	5	U·μL ⁻¹
	Tris/HCl pH 7,5	10	mM
	EDTA	0,1	mM
	Glyzerin	50	% (v/v)

4.15.1.5 Sequenzierungsgel

Zur Vorbereitung eines Sequenzgels [Sanger & Coulson, 1978] wurden zwei Glasplatten (34 x 42 bzw. 34 x 44 cm) mit H₂O und EtOH gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde die größere der beiden Platten mit 1 mL Sigmacote-Lösung und die andere mit Silan-Lösung behandelt und für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Reinigung und Trocknung der Platten wurden diese so übereinandergelegt, daß die behandelten Seiten nach innen wiesen. Getrennt wurden die beiden Platten durch ca. 1,5 cm breite 3MM Whatman-Papierstreifen, die auf den langen und einer kurzen Seite als Abstandhalter fungierten. Mit Hilfe von Klammern wurden die Komponenten in dieser Position fixiert.

Es wurde nun die Lösung für das Sequenzgel vorbereitet, die sich zunächst aus 50 g Harnstoff, 10 mL 10x TBE-Puffer und 36 mL H₂O zusammensetzte. Nach kurzer Erwärmung der Substanzen in einer Mikrowelle zur Lösung des Harnstoffes wurden 14 mL Acrylamid-Lösung, 100 μL TEMED und 300 μL 10% APS zugesetzt und die Lösung mit Hilfe einer Spritze in den Zwischenraum der Glasplatten transferiert, wo sie auspolymerisierte. Vor Verfestigung der Lösung wurde die letzte offene Seite des Gels mit den glatten Seiten zweier Haifischzahnkämme abgeschlossen und ebenfalls mit Klammern fixiert.

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde es in einer Sequenzgelapparatur befestigt, deren Kathoden- und Anodenreservoir mit 1x TBE-Puffer gefüllt wurde. Die Kämme wurden entfernt und, nach Spülen der Geloberfläche, mit den Zähnen voran ca. 1-2 mm tief in das Gel gesteckt, so daß Auftragstaschen entstanden, die erneut gespült werden mußten. Nach gleichmäßigem Erhitzen des Gels durch 30-minütiges Warmlaufen bei einer Leistung von 50 Watt wurden direkt vor dem Probenauftrag die Taschen erneut gespült, um den aus dem Gel gelösten Harnstoff zu entfernen. Die Elektrophorese fand bei 60-65 W statt und konnte 2 (Kurzlauf), 4 (Mittellauf), 6 (Langlauf), 8 oder sogar 10 h dauern.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die große Glasplatte und die Whatmann-Papierstreifen entfernt. Das Gel, das an der kleinen Platte haften blieb, wurde mit der Platte für 15 min in Fixierer eingelegt, anschließend wurde durch Spülen mit heißem Wasser der Harnstoff aus dem Gel entfernt. Im Anschluß daran wurde das Gel für 60 min bei 80°C getrocknet und dann üN autoradiographiert.

Silan-Lösung	EtOH	10	mL
	HOAc 10 % (w/v)	0,3	mL
	γ-Metacryloxy-propyl-trimethylsilan	30	μL
Acrylamid-Lösung	Acrylamid	38	% (w/v)
	Bisacrylamid	2	% (w/v)

10x TBE-Puffer	Tris	163,5	g·L ⁻¹
	Borsäure	29,9	g·L ⁻¹
	EDTA	9,3	g·L ⁻¹
Fixierer	HOAc	10	% (w/v)
	Methanol	10	% (w/v)

4.15.2 DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-Markierung

Auch bei der DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-Markierung wird die Kettenabbruchmethode nach Sanger angewendet. Jedoch werden hierbei im Gegensatz zur radioaktiven Methode markierte ddNTPs verwendet. Diese enthalten für jede der vier Basen einen chemisch an das Molekül gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer energetischen Anregung Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Somit ist es möglich die Sequenzierungsreaktion für die vier Basen in einem Reaktionsansatz durchzuführen. Unterwirft man einen solchen Ansatz einer elektrophoretischen Trennung, so können die DNA-Banden durch ihre Fluoreszenz detektiert werden und es läßt sich direkt die Sequenz der DNA-Matrize ermitteln. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß nur DNA-Moleküle detektiert werden können, die tatsächlich durch den Einbau eines ddNTPs terminiert wurden, so daß Fehler, die aus unspezifischen Kettenabbrüchen resultieren können, praktisch eliminiert werden.

4.15.2.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism™dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (*PE Applied Biosystems*) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden 500 ng DNA, 5 pmol Primer und 2 µL Terminations Mix (enthält dNTPs, markierte ddNTPs, Puffer und AmpliTaq®DNA-Polymerase FS) in einem 200 µL PCR-Reaktionsgefäß gemischt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Ansatz unter den folgenden Bedingungen in einem PCR-Gerät GeneAmp PCR System 2400 (*Perkin-Elmer*) inkubiert:

25 Zyklen	96°C	10 s
	50°C	5 s
	60°C	4 min

Hierbei wird in Analogie zu einer PCR-Reaktion (vgl. Kapitel 4.2) durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung (96°C), Hybridisierung des Primers (50°C) und Synthese eines zur Matrize komplementären DNA-Stranges (60°C), ein DNA-Abschnitt amplifiziert. Da man in dieser Reaktion jedoch nur einen Primer einsetzt, wird auch nur ein Strang der Vorlage-DNA verstärkt und somit sequenziert. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich DNA-Sequenzreaktion mit verhältnismäßig geringen Konzentrationen an Matrizen-DNA durchzuführen.

4.15.2.2 Aufarbeitung der Sequenzierungsreaktion

Der Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt mit 1 µL 3 M NaOAc (pH 5,2) und 25 µL 95 %igem EtOH gemischt und 20 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig mit 250 µL 70 %igem EtOH gewaschen, in einer Speed-Vac getrocknet und in 20 µL TSR (*template suppression reagent*) resuspendiert. Nach 2 min Denaturierung bei 95°C wurde die Probe blasenfrei in ein entsprechendes Probengefäß

pipettiert, welches zum Schutz vor Verdunstung mit einem Septum verschlossen wurde. Diese Proben wurden nun zur Sequenzanalyse mit dem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (*PE Applied Biosystems*) gemäß der Herstellerangaben eingesetzt.

4.16 Genexpression im pQE-Vektorsystem

Zur Expression von *bac*-Genfragmenten wurden 400 mL 2xYT (Amp¹⁰⁰Kan²⁵) 1:100 mit einer üN-Kultur des entsprechenden pQE-Derivates in einem *E. coli* M15[pREP4]- bzw. BL21[pREP4]-Stamm angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 30°C und 250 U·min⁻¹ in einem Wasserbadschüttler bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert, dann zur Induktion der Genexpression mit IPTG (0,1 mM Endkonz.) versetzt und für weitere 3 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Abschließend wurden die Zellen für 10 min abzentrifugiert (7.000 U·min⁻¹ und 4°C) und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert (vgl. Kapitel 4.18).

4.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen gemäß ihrer Größe und der Überprüfung der Reinheit von Proteinfractionen. Bei dieser Technik macht man sich die Eigenschaft des Natriumdodecylsulfates (SDS) zunutze, auf Proteine stark denaturierend zu wirken und mit einem nahezu konstanten Verhältnis sehr stark an sie zu binden. Es findet sich üblicherweise ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren an einem Protein. Durch die stark negative Ladung, die so durch die Dodecylsulfat-Anionen auf das Protein übertragen wird, findet eine Maskierung der tatsächlichen Ladung der Proteine statt, die dadurch ein fast identisches Ladung/Masse-Verhältnis besitzen. Werden die mit SDS-komplexierten Proteine in einem Polyacrylamidgel einem elektrischen Feld ausgesetzt, so hängt die Laufstrecke direkt von der Mobilität der SDS-Protein-Komplexe in der Acrylamidmatrix ab und ist proportional zu den korrespondierenden Proteinmassen.

Das verwendete Laemmli-System [Laemmli, 1970] besteht aus einem kurzen Sammelgel und einem längeren Trenngel. Hierbei besitzt das obere Sammelgel einen um zwei Einheiten niedrigeren pH-Wert. Diese Differenz umfaßt die pH-Bereiche in denen die Pufferkomponente Glyzin in einer formal ungeladenen zwitterionischen Form (pH 6,8; Sammelgel) und als einfach negativ-geladenes Glyzinat (pH 8,8; Trenngel) vorliegt. Im elektrischen Feld wandern nun die Chloridionen und die Proteine in Richtung der Anode, während das im Sammelgel ungeladene zwitterionische Glyzin zurückbleibt. Der hieraus resultierende Mangel an beweglichen Ionen wird durch eine erhöhte Spannung zwischen den Komponenten größter (Chlorid) und niedrigster (Glyzin) Mobilität im elektrischen Feld ausgeglichen. Die hohe Mobilität der stark negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe in diesem lokal hohen elektrischen Feld wird durch die größeren Poren des Sammelgels unterstützt. Sobald die Proteine die Chloridionen erreichen, werden sie umgehend abgebremst, da kein Ionen-Mangel und somit auch keine hohe elektrische Feldstärke mehr vorhanden ist. Hierdurch entsteht ein Sammeleffekt, der sich in einer Anhäufung der Proteine innerhalb einer schmalen Bande bemerkbar macht. Beim Übergang ins Trenngel gehen die ungeladenen Glyzin-Zwitterionen in den geladenen Zustand über, so daß die

Wanderungsgeschwindigkeit aller Komponenten ausschließlich von ihrer Mobilität abhängt. Im Trenngel, das eine geringere Porengröße als das Sammelgel aufweist, werden die Proteine somit nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Gelelektrophoresen wurden in 'mighty small' -Vertikalgelkammern (BioLabs Scientific) durchgeführt. Die Abmessung eines Trenngels betrug $90 \times 60 \times 0,75 \text{ mm}^3$. Die angegebenen Mengen Acrylamid-Lösung, Tris/HCl-Puffer und Wasser mußten zunächst gemischt und im Wasserstrahlvakuum entgast werden. Nach Zugabe der übrigen Bestandteile (SDS-Lösung, TEMED und APS-Lösung) wurde das Gel in eine mit 1 %iger Agarose abgedichtete Kammer gegossen und zur Erzeugung einer glatten Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol mußte nach der Polymerisation des Gels durch sorgfältiges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt werden. In das analog präparierte Sammelgel wurde zur Ausbildung von Probenaschen ein Kamm eingesetzt. Im Anschluß an die Polymerisation des Sammelgels konnte die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt werden, wobei auch das Gel mit Puffer überschichtet wurde. Abschließend konnte der Kamm entfernt, die hierdurch entstanden Probenaschen mit Laufpuffer gespült und die Proben aufgetragen werden. Die Auftragung der Proben erfolgte bei 10 mA/Gel, und die eigentliche Elektrophorese bei 20 mA/Gel (Sammelgel) bzw. 40 mA/Gel (Trenngel). Zur Herstellung von zwei Gelen wurden folgende Lösungen benötigt:

Acrylamid-Lösung	Acrylamid	30	% (w/v)
	N-N'-Methylen-bisacrylamid	0,8	% (w/v)
7,5%-iges Trenngel	Acrylamid-Lösung	2,50	mL
	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,50	mL
	H ₂ O	4,85	mL
	10%-ige SDS-Lösung	100	µL
	TEMED	10	µL
	10%-ige APS-Lösung	50	µL
5%-iges Sammelgel	Acrylamid-Lösung	0,83	mL
	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,25	mL
	H ₂ O	2,84	mL
	10%-ige SDS-Lösung	50	µL
	TEMED	5	µL
	10%-ige APS-Lösung	25	µL
SDS-PAGE-Laufpuffer	Tris-Base	25	mM
	Glyzin	192	mM
	SDS	7	mM

4.17.1 Präparation von Vollzellextrakten für die SDS-PAGE-Analyse

Die Zellen aus 1 mL einer Expressionskultur wurden 2 min abzentrifugiert ($13.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$), das Zellpellet in 75 µL Tris-Puffer resuspendiert und mit 25 µL 4x Probenpuffer gemixt. Durch 10 min Inkubation bei 95°C wurden die Zellen lysiert, die Proteine denaturiert sowie Cystingruppen durch β -ME gespalten. Von einer Probe, die bei einer OD₆₀₀ von 1,0 genommen wurde, wurden 10 µL auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Volumina der bei einer anderen OD₆₀₀ genommenen Proben wurden entsprechend angepaßt.

4x Probenpuffer	Tris/HCl pH6,8	500	mM
	SDS	8	% (w/v)
	Glyzerin	40	% (v/v)
	β -ME	20	% (v/v)
	Bromphenolblau	5	mg-l-l

4.17.2 Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gel in Färbelösung eingelegt, in der Mikrowelle kurz erhitzt und nach fünfminütigem Abkühlen unter Schütteln in Entfärber überführt. In diesem wurde es solange geschwenkt, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war und die blau gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden. Der Entfärbvorgang konnte durch mehrmaliges Erneuern des Entfärbers beschleunigt werden.

Färbelösung	EtOH	50	% (v/v)
	AcOH	10	% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue R 205	0,25	% (w/v)
Entfärber	EtOH	50	% (v/v)
	AcOH	10	% (v/v)

4.18 Präparation von Zell-Rohextrakten

Zur Präparation eines *E. coli* Rohzelleextraktes wurde das Zellpellet einer 400 mL Expressionskultur (vgl. Kapitel 4.16) in 10 mL Puffer A resuspendiert und in einer French Press (*SLM Aminco*) 2 bis 3 Kompressions-/Dekompressionszyklen unterzogen. Hierbei wurde die Zellsuspension unter hohem Druck (1000 MPa) durch einen kleinen Spalt gepreßt, so daß die Zellen durch die dadurch auftretenden Scherkräfte aufgeschlossen wurden. Die Zelltrümmer und unlöslichen Proteine wurden durch 30 min Zentrifugation (17.000 U·min⁻¹ und 4°C) abgetrennt.

Puffer A	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	NaCl	300	mM

4.19 IMAC an Ni²⁺-beladenen Chelatsäulen (FPLC)

Die Aufreinigung der mit sechs Histidin-Resten fusionierten Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie. Hierbei ist Nitrilotriacetat (NTA) kovalent an die Säulenmatrix gebunden. NTA kann vier der sechs Koordinationsstellen von Ni²⁺-Ionen besetzt und diese dadurch an der Säulenmatrix immobilisieren [Porath *et al.*, 1975; Hochuli, 1989]. Proteine mit chelatbildenden Seitengruppen wie Histidin können die freien Koordinationsstellen besetzen und binden so an die Säule. Besonders fest ist die Bindung von His₆-Proteinen, sie ist stärker als die von Antigen/Antikörper-Komplexen. Die Elution der Proteine erfolgt durch das Anlegen eines Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol, das an die Nickelmatrix bindet und das Fusionsprotein verdrängt.

Um unspezifische Bindungen an die Ni²⁺ beladenen Chelatsäulen zu verhindern, wurde der Proteinextrakt von *E. coli* Zellen erst mit 0,1 Volumen des imidazolhaltigen Puffers B versetzt und dann auf die Säule aufgetragen. Beim Durchlaufen der Säule, die ein

Bettvolumen von 2 mL hatte, passierte der Großteil der Proteine die Gelmatrix, nur das Fusionsprotein und einige zelluläre Proteine mit vielen chelatbildenden Seitengruppen wurden an die Nickelmatrix gebunden. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen eines Puffer A/B-Gemisches (9:1) gespült, bevor der Anteil des Puffer B sukzessive auf 100% erhöht wurde. Die Flußrate betrug sowohl beim Aufladen und Waschen als auch bei der Fraktionierung $0,75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Es wurden 1,5 mL Fraktionen aufgefangen, die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen bestimmt und die jeweiligen Proben durch SDS-PAGE analysiert.

Puffer B	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	NaCl	300	mM
	Imidazol	250	mM

4.20 Entsalzen von Proteinlösungen (Dialyse)

Zur Entfernung des Imidazols und zur Einstellung definierter Pufferbedingungen wurden die durch IMAC fraktionierten Proteinproben mehrmals für mindestens 1 h gegen das 100-fache Volumen des frischen Dialysepuffers (50 mM Natriumphosphat pH 8,0) dialysiert. Hierzu mußte ein Dialyseschlauch zunächst zur Entfernung von Nukleasen, Proteasen und Schwermetallionen in 10 mM EDTA-Lösung ausgekocht und anschließend gründlich mit H_2O gespült werden. Nachfolgend wurde die Probe in den Dialyseschlauch überführt und dialysiert.

4.21 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.21.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Methode von Bradford [Bradford, 1976] angewandt, die darauf beruht, daß das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Blue durch Bindung an Proteine von 465 nach 595 nm verschoben wird. Mißt man die OD_{595} einer Proteinlösung, der eine Coomassie Blue-Lösung zugesetzt wurde, so steht diese in linearer Abhängigkeit zur Konzentration der Proteinlösung, sofern diese im Bereich zwischen 10 und $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ liegt.

Zur Bestimmung einer Eichgerade wurde die OD_{595} von BSA-Lösungen herangezogen, die Konzentrationen von 0, 10, 20, 40, 60, 80 und $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ besaßen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten in einem Titertec Multiscan Plus Photometer (*Flow Laboratories*). In den Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden je 10 μL Proteinlösung unterschiedlicher Verdünnung mit 100 μL Bradford-Lösung vereinigt und nach 5 min Inkubation bei RT einer Absorptionsmessung bei 595 nm unterzogen.

Bradford-Lösung	EtOH	5	% (v/v)
	Phosphorsäure (85%)	10	% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G-250	0,01	% (w/v)

4.21.2 Proteinbestimmung nach Gill und von Hippel

Bei diesem Verfahren [Gill *et al.*, 1989] wird die Proteinkonzentration direkt über die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm bestimmt.

Nach der Formel

$$C_{\text{nat}} = \text{Abs} / \varepsilon_{\text{nat}} \quad (1)$$

läßt sich die Konzentration einer Proteinlösung über den Quotienten aus der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge und dem für das Protein spezifischen molaren Absorptionskoeffizienten ε berechnen. Da sich ε für ein natives Protein nicht berechnen läßt, untersuchten Gill und von Hippel die Absorptionskoeffizienten für denaturierte Proteine. Sie stellten fest, daß sich die Absorptionskoeffizienten der denaturierten Proteine aus den Absorptionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein nach der folgenden Formel zusammensetzten, wobei a, b und c für die Anzahl der einzelnen Aminosäuren im jeweiligen Protein steht:

$$\varepsilon_{\text{denat}} = a\varepsilon_{\text{Tyr}} + b\varepsilon_{\text{Trp}} + c\varepsilon_{\text{Cys}} \quad (2)$$

Die nach dieser Formel berechneten Absorptionskoeffizienten lassen sich mit einem durchschnittlichen Fehler von 3.8% auf die Absorptionskoeffizienten der entsprechenden nativen Proteine übertragen, weshalb Formel (1) ersetzt werden kann durch

$$C_{\text{nat}} = \text{Abs} / \varepsilon_{\text{denat}} \quad (3)$$

Die Absorptionskoeffizienten der Aminosäuren wurden bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt und sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Für die Bestimmung der Koeffizienten wurden Derivate der Aminosäuren benutzt.

Tabelle 4-1 Molare Absorptionskoeffizienten von Aminosäure-Derivaten

Aminosäure-Derivat	Absorptionskoeffizient ε [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] bei				
	276 nm	278 nm	279 nm	280 nm	282 nm
N-Acetyl-L-Tryptophan-amid	5400	5600	5660	5690	5600
Gly-L-Tyr-Gly	1450	1400	1345	1280	1200
Cystein	145	127	120	120	100

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen, muß also die Absorption der Lösung bzw. einer definierten Verdünnung gemessen werden und der Absorptionskoeffizient ε des zu messenden Proteins nach Formel (2) mit Hilfe der Tabelle 4-1 berechnet werden. Setzt man diese Werte in Formel (3) ein, so erhält man die Konzentration der Lösung in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.22 Ankonzentrierung von Proteinproben

Aufgereinigte Proteinproben konnten in einer Ultrafiltrationseinheit 8050 (*Amicon*) ankonzentriert werden. Hierbei wurde die entsprechende Proteinlösung unter ständigem Rühren bei einem Druck von 1 bar durch einen Filter mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa gedrückt. Proteine, die größer als 10 kDa waren, konnten den Filter nicht passieren und wurden somit in der Lösung über dem Filter ankonzentriert.

4.23 ATP-PP_i-Austauschreaktion mit PPS-Modulen

Der erste Schritt bei der Aminosäureaktivierung durch PPS ist die Bildung eines enzymassoziierten Aminoacyladenylates unter ATP-Hydrolyse [Stuhlberg *et al.*, 1960; Gevers *et al.*, 1968; Lee *et al.*, 1975]. Da es sich hierbei um eine reversible Reaktion handelt, kann die Rückreaktion dazu genutzt werden, eine Proteinprobe *in vitro* auf ihre spezifische Aminosäure-aktivierende Eigenschaft hin zu untersuchen. Hierzu wird dem Reaktionsansatz [³²P]-Pyrophosphat zugesetzt, das während der Rückreaktion zur Bildung von radioaktiv markiertem [³²P]-ATP führt. Da ATP an Aktivkohle absorbiert, kann das Nukleotid selektiv aus dem Reaktionsansatz abgetrennt und der Anteil an radioaktiv markiertem ATP bestimmt werden. Dabei ist die Menge an Radioaktivität proportional zur ATP-PP_i-Austauschrate und somit zur spezifischen Aminosäure-aktivierenden Eigenschaft der Proteinprobe.

45 µL Proteinlösung (ca. 30 pmol) wurden mit 5 µL Aminosäurelösung (20 mM) und 50 µL 2x Austauschmix bei 0°C vermischt und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Blindwerte wurden identische Ansätze mit H₂O anstatt der Aminosäurelösung versetzt und ebenfalls 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 0,5 mL eiskalter Terminationslösung wurde gemixt, 1 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹), das Pellet in 1 mL H₂O resuspendiert und erneut 1 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹). Das resultierende Pellet wurde nun in 0,5 mL H₂O resuspendiert, in 20 mL-Polypropylenmeßfläschchen überführt, mit je 4 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus (Roth) versetzt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer (Packard) gemessen.

2x Austauschmix	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	MgCl ₂	10	mM
	ATP	10	mM
	Natriumpyrophosphat	0,2	mM
	[³² P]- Pyrophosphat	0,1	µCi
Terminationslsg.	Natriumpyrophosphat	100	mM
	Perchlorsäure	560	mM
	Aktivkohle (Norit A)	1,2	% (w/v)

4.24 *in vitro* Modifikation von PPS-Modulen mit 4'-PAN

In der zweiten Stufe der nicht-ribosomalen Peptidsynthese werden die als Aminoacyladenylate aktivierten Aminosäuren als Thioester auf 4' -Phosphopantethein-Kofaktoren (4'-PAN) geladen, die kovalent mit den T-Domänen von PPS-Modulen verknüpft sind [Gevers *et al.*, 1968]. Diese T-Domänen tragen eine Erkennungssequenz (LGGxS) mit einem invarianten Serinrest, der posttranslational durch eine 4' -PAN Transferase wie z. B. Sfp aus *B. subtilis* oder Bli aus *B. licheniformis* mit dem Kofaktor beladen wird [Gaidenko *et al.*, 1988; Lambalot *et al.*, 1996; Stachelhaus *et al.*, 1996a; Quadri *et al.*, 1998]. Da bei einer heterologen Expression von PPS-Modulen in *E. coli* diese Modifikation nicht *in vivo* stattfindet, mußten die aufgereinigten Domänenproteine nachträglich durch eine *in vitro* Reaktion modifiziert werden. Wird hierbei [³H]-CoA eingesetzt, kann nach einer TCA-Fällung des Proteins die Menge an enzymgebundenen 4' -PAN quantifiziert werden.

50 µL Proteinlösung (ca. 50 pmol) wurden mit 50 µL Beladungsmix versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Reaktionsansätze mit nicht radioaktiv markiertem CoA konnten nach dieser

Inkubation für Folgereaktionen eingesetzt werden (vgl. Kapitel 4.25 und 4.26). Bei Verwendung von [^3H]-CoA wurde nach 60 min mit 800 μL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung und 15 μL BSA-Lösung (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) als Carrier versetzt, vortexiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (13.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ und 4°C), das Pellet zweimal mit je 1 mL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung gewaschen und abschließend in 300 μL Ameisensäure resuspendiert. Diese Suspension wurde nun in 20 mL-Polypropylenmeßfläschchen überführt, mit je 4 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus (Roth) versetzt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer (Packard) gemessen.

Beladungsmix	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	MgCl_2	10	mM
	Sfp bzw. Bli	0,2	μM
	CoA oder	0,3	mM
	[^3H]-CoA	3	μCi

4.25 Beladung von PPS-Modulen mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Die kovalente Beladung von PPS-Modulen mit ihren Substrataminosäuren kann durch die Inkubation der *in vitro* modifizierten Proteine mit radioaktiv markierten Aminosäuren und ATP simuliert werden. Eine anschließende Präzipitation des Proteins mit TCA führt zur Kopräzipitation der gebundenen Aminosäure, während die freie Aminosäure ausgewaschen werden kann. Der Blindwert wird aus einem entsprechenden Reaktionsansatz ohne ATP bestimmt.

Ein Reaktionsansatz zur *in vitro* Beladung mit 4'-PAN (vgl. Kapitel 4.24) wurde nach 60 min Inkubation bei 37°C mit ATP (2 mM Endkonz.) und der radioaktiv markierten Aminosäure (2 μCi [^{14}C]-Ile oder 0,3 μCi [^{35}S]-Cys) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde durch Zugabe von 800 μL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung die Reaktion gestoppt. Für eine Quantifizierung der gebundenen Aminosäure wurde mit 15 μL BSA-Lösung (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) als Carrier versetzt, vortexiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Sollte die Probe für eine Analyse auf einem SDS-PAGE und eine nachfolgende Autoradiographie eingesetzt werden, wurde ohne Zugabe von BSA präzipitiert. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (13.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ und 4°C), das Pellet zweimal mit je 1 mL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung gewaschen und abschließend in 300 μL Ameisensäure bzw. 50 μL 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Diese Suspensionen wurden nun zur Analyse in einem Szintillationszähler oder auf einem SDS-PAGE eingesetzt.

4.26 Produktanalyse von Reaktionen mit BacA1-2

Das Dimodulprotein BacA1-2 katalysiert erwartungsgemäß eine Verknüpfung der beiden Substrataminosäuren Isoleucin und Cystein über eine Peptidbindung und nachfolgend möglicherweise die Ausbildung eines Thiazolinringes zwischen diesen beiden Aminosäuren. Gemäß dem allgemeinen Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese liegen nach erfolgter Reaktion die beiden putativen Produkte als Thioester kovalent an das Enzym gebunden vor. Somit ist es möglich diese Produkte durch eine Thioesterspaltung von dem Protein abzutrennen und gezielt zu analysieren.

4.26.1 Oxidative Thioesterspaltung

Bei der oxidativen Thioesterspaltung wird das Enzym nach erfolgter Reaktion unter erhöhten Temperaturen mit Perameisensäure behandelt, wodurch Thiogruppen oxidiert werden. Thioester werden hierbei bis zur Stufe der Sulfonsäure oxidiert, anschließend hydrolysiert und somit irreversibel gespalten. Hierzu wurde ein zweifacher Reaktionsansatz zur *in vitro* Modifikation mit 4' -PAN (vgl. Kapitel 4.24) für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit ATP (2 mM Endkonz.), einer nicht markierten Substrataminosäure (Ile bzw. Cys, 2 mM Endkonz.) sowie der zweiten Substrataminosäure in radioaktiv markierter Form (2 µCi [¹⁴C]-Ile oder 0,3 µCi [³⁵S]-Cys) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung gestoppt und das beladene Protein durch 30 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch 10 min Zentrifugation (13.000 U·min⁻¹ und 4°C) abgetrennt, fünfmal mit je 1 mL TCA-Lösung und zweimal mit 1,5 mL Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurde das sichtbare Pellet in einer Speed-Vac getrocknet, in 80 µL Ameisensäure und 20 µL 30 %igem Wasserstoffperoxid resuspendiert und 30 min bei 56°C inkubiert [Frøyskov *et al.*, 1970; Keller, 1987]. Der Reaktionsansatz wurde dann im Ölpumpenvakuum getrocknet, in 330 µL 50 %igem Ethanol aufgenommen und gründlich, mindestens 5 min vortexiert. Anschließend wurde die Probe kurz zentrifugiert, bevor der Überstand abgenommen und in einer Speed-Vac bis zur Trockne eingengt werden konnte. Abschließend wurde das kaum sichtbare Pellet in 20 µL 50 %igem Ethanol aufgenommen und auf eine DC-Platte aufgetragen (vgl. Kapitel 4.26.4).

4.26.2 Alkalische Thioesterspaltung

Da durch eine Behandlung mit Perameisensäure Thiazoline eine Ringöffnung erfahren können, wurde eine zweite Methode der Thioesterspaltung angewendet, bei der durch das Einwirken einer Base unter erhöhten Temperaturen eine Thioesterhydrolyse induziert wurde. Hierzu wurde in Analogie zu Kapitel 4.26.1 eine Reaktion durchgeführt und das Protein mit TCA präzipitiert. Jedoch wurde im folgenden das Präzipitat dreimal mit je 1 mL eiskalter, 10 %iger TCA-Lösung, einmal mit 1 mL eines Diethylether-Ethanol-Gemisches (3:1) und zweimal mit je 1 mL Diethylether gewaschen. Nach einer Trocknung bei 37°C wurde das Pellet gründlich in 100 µL 100 mM KOH resuspendiert und 20 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde mit 1 mL 95 %igem Methanol versetzt, 30 min zentrifugiert (13.000 U·min⁻¹ und 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in einer Speed-Vac bis zur Trockne eingengt. Das resultierende Pellet wurde in 20 µL n-Butanol aufgenommen und auf eine DC-Platte aufgetragen (vgl. Kapitel 4.26.4).

4.26.3 Butanol-Extraktion

Thioester weisen unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (pH 8,0) eine meßbare Hydrolyseneigung auf, so daß zumindest eine partielle hydrolytische Freisetzung der Reaktionsprodukte zu erwarten ist. Da im Gegensatz zu den Substrataminosäuren weder das lineare noch das thiazolinhaltige Dipeptid als Substrat für BacA1-2 fungieren können, ist eine erneute Beladung des Proteins mit diesen Spaltprodukten ausgeschlossen. Somit akkumuliert sich bei hinreichender Reaktionsdauer ein relevanter Anteil der Produkte in der Reaktionslösung. Um dies zu untersuchen, wurden in Analogie zu Kapitel 4.26.1 Reaktionsansätze durchgeführt, bei denen jedoch nach Zugabe der Aminosäuren und ATP für

2 h bei 37°C inkubiert wurde. In präparativen Experimenten zur HPLC-Analyse wurden zehnfache Ansätze in Gegenwart beider nicht radioaktiv markierter Substrataminosäuren (2 mM Endkonz.) durchgeführt. Anschließend wurde zweimal mit je einem Volumen n-Butanol extrahiert, die organische Phase in einer Speed-Vac eingengt der verbliebene Rückstand in einem geeigneten Volumen 50 %igem Ethanol aufgenommen und zur DC- oder HPLC-Analyse eingesetzt.

4.26.4 DC-Analyse

Zur Analyse der Reaktionsprodukte einer durch BacA1-2 katalysierten Reaktion wurden die Proben der Thioesterspaltung und butanolischen Extraktion auf eine DC-Platte aufgetragen. Hierbei wurden sowohl Silica G60- (*Merck*) als auch Cellulose DC-Platten (*Merck*) verwendet, die in ihren spezifischen Solventgemischen entwickelt wurden. Nach erfolgter Auftrennung konnten die Spaltprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Solventgemisch für Silica-DC	n-Butanol	57	% (v/v)
	AcOH	14	% (v/v)
	H ₂ O	29	% (v/v)
Solventgemisch für Cellulose-DC	n-Butanol	25	% (v/v)
	AcOH	25	% (v/v)
	Ethylacetat	25	% (v/v)
	H ₂ O	25	% (v/v)

4.26.5 Reversed Phase HPLC-Analyse

Bei dieser Methode werden Substanzgemische gemäß ihrer hydrophoben Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial aufgetrennt. Das verwendete Säulenmaterial besteht aus C₁₈-Kohlenstoffketten, die kovalent an eine Silicamatrix gebunden sind und somit der stationären Phase hydrophobe Eigenschaften vermitteln. Als mobile Phase dient ein Gemisch einer polaren und einer unpolaren Flüssigkeit. Während der Trennung wird in einem Gradienten der Anteil der unpolaren Komponente kontinuierlich erhöht, so daß die Elutionskraft der mobilen Phase sukzessive zunimmt. Hierdurch ist es möglich komplexe Substanzgemische bei hoher Auflösung und kurzen Laufzeiten effektiv aufzutrennen.

Die HPLC-Trennung von butanolischen Extrakten präparativer Reaktionsansätze von BacA1-2 wurde an einer Sephasil™ C-18 Säule (120 Å Porengröße und 5 µm Partikelgröße; *Pharmacia*) mit einer Flußrate von 1 mL·min⁻¹ und einem linearen Gradienten von 4 bis 20 % Solvent B in Solvent A durchgeführt. Die Detektion erfolgte an einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm.

Solvent A	Trifluoressigsäure	0,1	% (v/v)
	H ₂ O	99,9	% (v/v)
Solvent B	Trifluoressigsäure	0,1	% (v/v)
	Acetonitril	99,9	% (v/v)

4.27 Nachweis von Surfactin auf Blutagarplatten

Die hämolysische Aktivität des Surfactins wurde auf Glucose-Minimalmedium-Blutagarplatten getestet. Die in diesen Platten enthaltenen Erythrozyten werden durch die

Aktivität des Surfactins lysiert [Arima *et al.*, 1968; Nakano *et al.*, 1988] wodurch helle, durchsichtige Zonen im ansonsten trüben, roten Agarmedium entstehen.

Zu einer autoklavierten, flüssigen und ca. 60°C warmen Agarlösung wurden die unten angegebenen Bestandteile sterilfiltriert und unter stetigem Schwenken des Kolbens das Schafsblut zugegeben. Hierbei mußte eine übermäßige Schaumbildung vermieden werden. Die Platten wurden anschließend sehr zügig gegossen, da diese Agarmischung extrem schnell erstarrt. Auf diese Platten konnten *Bacillus*-Zellen mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert werden.

Blutagarplatten	H ₂ O/1,2 g Agar (autoklaviert)	80	mL
	10xT-Base	10	mL
	1,2 %ige MgSO ₄ -Lsg.	1	mL
	50 %ige Glucose-Lsg.	1	mL
	10 %ige Na-Glutamat-Lsg.	0,1	mL
	Schafsblut	8	mL

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung von PPS-Genfragmenten aus *B. licheniformis* ATCC 10716

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, besitzen die PPS eine geordnete modulare Architektur. Die spezifischen Module setzen sich wiederum aus noch kleineren Einheiten, den funktionellen Domänen, zusammen, welche die einzelnen Reaktionsschritte der nicht-ribosomalen Peptidsynthese katalysieren. Innerhalb dieser Domänen sind hochkonservierte Sequenzbereiche, die sogenannten Core-Motive, identifiziert worden, deren fest definierte Abfolge ein charakteristisches Merkmal der PPS darstellt (vgl. Kapitel 2.6). Ausgehend von diesen Core-Motiven ist es gelungen, eine PCR-Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe es möglich ist, gezielt PPS-Gene zu identifizieren [Turgay *et al.*, 1994]. Hierzu werden die chromosomale DNA des Zielorganismus und degenerierte Oligonukleotide, die sich von den Core-Motiven A7 und T ableiten, in eine Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Enthält die eingesetzte genomische DNA Gene, die für PPS kodieren, so ist es durch Variation der Hybridisierungstemperaturen (40-60°C) zumeist möglich, spezifische Bereiche dieser Gene zu amplifizieren (vgl. Abbildung 5-1).

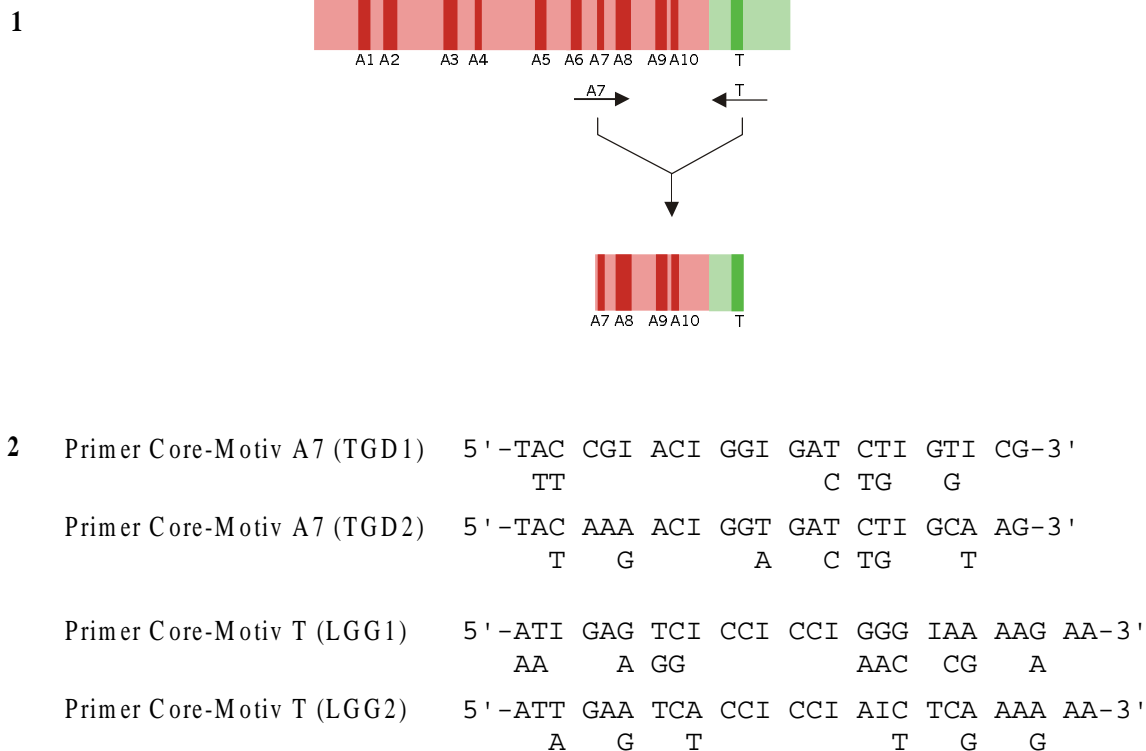


Abbildung 5-1 PCR-Methode zur Identifikation von PPS-Genen (1) unter Verwendung degenerierter Primer, die sich von den Core-Motiven A7 und T ableiten (2) [Turgay & Marahiel, 1994].

Mit Hilfe dieser PCR-Methode gelang es, aus chromosomaler DNA des Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 zwei, voneinander unabhängige PCR-Fragmente zu amplifizieren. Die beiden ca. 500 bp großen Amplifikate PCR01 (Primer TGD1/LGG1) und PCR05 (Primer TGD2/LGG2) wurden nachfolgend in den pCR-Script Vektor kloniert und ihre DNA-Sequenz bestimmt (vgl. Anhang 7.2). Hierzu wurden die beiden Standard-Primer 'Universal' und 'Reverse' eingesetzt, die in unmittelbarer Nachbarschaft zur MCS des pCR-Script-Vektors hybridisieren.

Universal-Primer : 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverse-Primer : 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Dadurch konnte gezeigt werden, daß beide Fragmente die internen Core-Motive A8-A10 in den für PPS typischen Lokalisationen trugen. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß über diese Methode tatsächlich zwei Bereiche von PPS-Genen isoliert wurden.

5.2 Konstruktion einer Lambda EMBL III Genbank chromosomaler DNA aus *B. licheniformis*

Um einen möglichst großen, zusammenhängenden Teil der gefundenen putativen PPS-Gene zu identifizieren, wurde eine Lambda EMBL III Genbank chromosomaler DNA aus *B. licheniformis* ATCC 10716 konstruiert. Dieses System erlaubt eine Klonierung von bis zu 23 kb großen DNA-Fragmenten.

Chromosomale DNA aus *B. licheniformis* wurde zunächst wie unter Kapitel 4.14.1 beschrieben in einer Optimierungsreihe mit der Restriktionsendonuklease *Sau3* AI partiell verdaut, so daß DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe entstanden. Bei einer Enzymkonzentration von ca. $0,01 \text{ U} \cdot \mu\text{g}(\text{DNA})^{-1}$ wurden DNA-Fragmente einer durchschnittlichen Größe von ca. 20 kb erhalten. Unter Verwendung dieser Enzymkonzentration wurden nun präparative Restriktionsansätze (100 μg DNA) durchgeführt und die resultierenden DNA-Fragmente über eine NaCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Fraktionen, die DNA-Fragmente einer geeigneten Größe enthielten, wurden vereinigt und anschließend dephosphoryliert. Der entsprechende Reaktionsansatz wurde mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Chloroform extrahiert, die DNA einer Ethanol-Fällung unterzogen und schließlich in H_2O gelöst ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Für die anschließende Ligation wurden 0,5 μg dephosphorylierte DNA und 1 μg Lambda EMBL III/*Bam*H I-Arme (*Stratagene*) eingesetzt. Ein Drittel dieses Ligationsansatzes wurde nachfolgend unter Verwendung des Gigapack® III Gold Packaging Extract (*Stratagene*) zur Verpackung in Lambda-Phagenköpfe angeboten. Die so erhaltene Genbank wurde zur Konservierung mit 20 μL Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Phagentiters wurde eine Verdünnungsreihe der Genbank hergestellt und mit jeweils 1 μL dieser Verdünnungen eine Phageninfektion durchgeführt. Nach einer Inkubation üN bei 37°C zeigten sich auf dem dichten Zellrasen klare Phagenplaques. Durch Auszählen der Plaques wurde ein Phagentiter von ca. $1 \cdot 10^6$ pfu ermittelt.

5.3 Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons

5.3.1 Klonierung und Sequenzierung des Bacitracin-Biosynthese-Operons

Für das Screening der Genbank wurde zunächst das unter Kapitel 5.1 beschriebene PCR05-Fragment als Sonde, als Teil eines putativen PPS-Gens eingesetzt. Phagenklone, deren Insert-DNA mit dieser Sonde ein Hybridisierungssignal ergaben, sollten einen größeren Abschnitt des gesuchten Gens enthalten.

Es wurden Phageninfektionen mit 2,5 µL der 1:10 verdünnten Genbank durchgeführt, so daß sich nach Inkubation üN bei 37°C ca. 300-400 räumlich voneinander getrennte Phagenplaques pro Kulturplatte befanden. Diese Platten wurden nun mit der Methode der Plaquefilterhybridisierung nach rekombinanten Phagenklonen durchmustert, die einen zur PCR05-Sonde homologen DNA-Bereich enthielten. Insgesamt konnten aus den ca. $8 \cdot 10^3$ analysierten Phagen sieben Klone, die ein eindeutiges Hybridisierungssignal mit der verwendeten Sonde ergaben, isoliert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Die DNA dieser Phagen wurde isoliert und die klonierten Inserte durch eingehende Restriktions- und Southern-Analysen physikalisch kartiert (Daten nicht gezeigt). Einer der Klone (λ -BA1) trug den zur PCR05-Sonde homologen DNA-Abschnitt in einem zentralen Bereich seines Insertes und wurde daher intensiver analysiert (vgl. Abbildung 5-2).

Das Insert von λ -BA1 wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Bam*H I, *Eco*R I, *Pst* I und *Sal* I in den pBluescript II SK(-)-Plasmidvektor subkloniert. Die Inserte der resultierenden Plasmide wurden mit Standard-Primern (vgl. Kapitel 5.1) terminal ansequenziert und die ermittelten DNA-Sequenzen mit Hilfe des BLASTX-Programmes für Sequenzvergleiche mit der 'GenBank'-Datenbank eingesetzt [Fish *et al.*, 1993]. Hierbei zeigte sich, daß das λ -BA1-Insert über den gesamten Bereich von 19,5 kb Homologie zu PPS-Genen aufwies. Somit war es zur kompletten Klonierung des identifizierten PPS-Gens notwendig, weitere Phagenklone zu isolieren, die den klonierten Bereich des λ -BA1-Insertes möglichst weit in 5' - bzw. 3' -terminale Richtung erweiterten. Hierzu wurden in einer zweiten Runde des Genbank-Screenings terminale Restriktionsfragmente des λ -BA1-Insertes als Sonden eingesetzt (vgl. Abbildung 5-2). Es konnten 14 Phagenklone mit Sonde A und 17 Klone mit Sonde B isoliert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Auch aus diesen Phagen wurde die DNA isoliert und ihre Inserte physikalisch kartiert. Im folgenden wurden dann die Phagenklone λ -A14.3 (18 kb Insert) und λ -B13.2 (16 kb Insert), die einen vergleichsweise geringen überlappenden Bereich mit λ -BA1 aufwiesen (vgl. Abbildung 5-2), intensiv untersucht. Die Inserte dieser Phagen wurden ebenfalls in der oben beschriebenen Art in Plasmidvektoren subkloniert und terminal ansequenziert. Bei den folgenden Sequenzvergleichen wiesen die terminalen Bereiche dieser Phageninserte keinerlei Homologie zu PPS-Genen mehr auf, so daß von einer kompletten Klonierung des identifizierten PPS-Gens ausgegangen werden konnte.

Insgesamt umfassen die Inserte der isolierten Phagenklone λ -BA1, λ -BA14.3 und λ -B13.2 einen zusammenhängenden Bereich von ca. 46 kb des *B. licheniformis* Genoms. Dieser Bereich wurde größtenteils in Plasmidvektoren subkloniert (vgl. Tabelle 5-1). Verbliebene Lücken zwischen den Plasmidsubklonen konnten durch PCR-Amplifikation der entsprechenden Bereiche aus chromosomaler DNA geschlossen werden. Diese PCR-Fragmente

und Plasmide dienten nun als Matrizen für DNA-Sequenzierungen. Hierbei wurde zur kompletten Bestimmung der DNA-Sequenz eine *primer-walking*-Strategie verwendet, bei der aus den jeweils bestimmten DNA-Sequenzen neue Oligonukleotid-Primer für die nachfolgenden Sequenzierungsschritte abgeleitet wurden. Zur Verifizierung der analysierten DNA-Sequenzen wurden ebenfalls die entsprechenden DNA-Gegenstränge sequenziert. Somit wurden insgesamt 44883 bp analysiert, die einen für *B. licheniformis* typischen GC-Gehalt von 46 % aufweisen. Die hier beschriebene DNA-Sequenz ist in der ' GenBank' -Datenbank unter AF007865 gespeichert [Konz *et al.*, 1997].

Tabelle 5-1 Plasmidsubklone der Lambdaphagen λ -BA1, λ -A14.3 und λ -B13.2

Plasmidklon	5'-Enzym (Position)	3'-Enzym (Position)	Größe
pA14.3B4.1	<i>Bam</i> H I (bp 1)	<i>Bam</i> H I (bp 4410)	4410 bp
pA14.3B6.1	<i>Bam</i> H I (bp 4410)	<i>Bam</i> H I (bp 10203)	5793 bp
pBA1P2	<i>Pst</i> I (bp 6740)	<i>Pst</i> I (bp 9059)	2319 bp
pBA1P1	<i>Pst</i> I (bp 9206)	<i>Pst</i> I (bp 11120)	1914 bp
pBA1PS2	<i>Pst</i> I (bp 9206)	<i>Sal</i> I (bp 10860)	1654 bp
pBA1P6	<i>Pst</i> I (bp 11120)	<i>Pst</i> I (bp 17431)	6311 bp
pBA1PS5	<i>Pst</i> I (bp 17431)	<i>Sal</i> I (bp 24003)	6572 bp
pBA1B1	<i>Bam</i> H I (bp 21833)	<i>Bam</i> H I (bp 29507)	7674 bp
pBA1PS1	<i>Pst</i> I (bp 29408)	<i>Sal</i> I (bp 30752)	1344 bp
pBA1PS1	<i>Sal</i> I (bp 30752)	<i>Sal</i> I (bp 34988)	4236 bp
pB13.2E6	<i>Eco</i> R I (bp 30860)	<i>Eco</i> R I (bp 38588)	7728 bp
pB13.2E15	<i>Eco</i> R I (bp 38588)	<i>Eco</i> R I (bp 40058)	1470 bp
pB13.2E15	<i>Eco</i> R I (bp 40058)	<i>Eco</i> R I (bp 42358)	2300 bp
pB13.2E15	<i>Eco</i> R I (bp 42358)	<i>Eco</i> R I (bp 44878)	2520 bp

5.3.2 Sequenzanalyse des *bac*-Operons

Durch die intensive Sequenzanalyse des klonierten Bereichs konnten drei große offene Leseraster (ORF) mit derselben Transkriptionsrichtung identifiziert werden. Das erste ORF, welches im folgenden als *bacA* bezeichnet wird, umfaßt 15.768 bp und kodiert somit für ein Protein von 5.255 Aminosäuren Länge. Aus der abgeleiteten Aminosäurezusammensetzung läßt sich für das BacA-Protein eine theoretische Masse von 598.379 Da berechnen. Detaillierte Sequenzvergleiche mit der deduzierten Aminosäureabfolge zeigten, daß es sich hierbei um eine PPS mit 5 Modulen handelt. Die Module setzen sich je aus AT-Minimalmodulen zusammen, welche durch C-Domänen miteinander verknüpft sind. Das erste Modul besitzt jedoch keine N-terminale C-Domäne. Eine solche Organisation wurde bisher nur bei PPS-Modulen identifiziert, die an der Initiation der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt sind (vgl. Abbildung 2-4) [Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997; Mootz & Marahiel, 1997a]. Daher kann für das erste Modul von BacA eine analoge Funktion postuliert werden. Die zwischen den ersten beiden Modulen von BacA lokalisierte C-Domäne ist stark modifiziert und weist auf Sequenzebene einige Besonderheiten auf, die in Kapitel 5.3.3 näher beschrieben werden. Darüber hinaus konnte im C-terminalen Bereich des vierten AT-Minimalmoduls eine E-Domäne identifiziert werden, so daß in dem gebildeten Produktpeptid an der korrelierenden Position der Einbau einer D-Aminosäure zu erwarten ist (vgl. Abbildung 5-2).

Die hier beschriebene Domänenabfolge des Translationsproduktes von *bacA* spiegelt in perfekter Übereinstimmung die biochemischen Eigenschaften der Bacitracin-Synthetase BA1 wider [Ishihara & Shimura, 1974; Frøyshov, 1984]. Dieses Enzym initiiert die nicht-ribosomale Bacitracinsynthese und ist für die kovalente Verknüpfung der N-terminalen fünf Aminosäuren von Bacitracin verantwortlich. Die vierte Aminosäure des gebildeten Pentapeptids wird in der D-Form eingebaut. Darüber hinaus induziert BA1 auf der Stufe des Di-peptids die Bildung eines Thiazolinringes zwischen den ersten beiden Aminosäuren Ile¹ und Cys² [Ishihara & Shimura, 1979; Ishihara & Shimura, 1988]. Dieser Befund korreliert mit dem Auftreten der oben beschriebenen ungewöhnlichen C-Domäne zwischen den ersten beiden BacA-Modulen (vgl. Kapitel 5.3.3). Somit kann zusammenfassend gefolgert werden, daß *bacA* tatsächlich das Strukturgen der Bacitracin-Synthetase BA1 darstellt.

Das zweite ORF (*bacB*) ist 7.824 bp groß und kodiert für ein 2.607 Aminosäuren langes Protein mit einer berechneten Masse von 297.428 Da. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz lassen sich zwei AT-Minimalmodule identifizieren, die durch eine C-Domäne miteinander verbunden sind. N-terminal zum ersten AT-Minimalmodul ist eine weitere C-Domäne lokalisiert. Das zweite AT-Minimalmodul wird zusätzlich durch eine C-terminale E-Domäne erweitert. Somit steht diese Domänensequenz mit den Merkmalen der zweiten Bacitracin-Synthetase BA2, welche das von BA1 gebildete Pentapeptid um zwei Aminosäuren erweitert und an siebenter Position eine D-Aminosäure einbaut, in genauem Einklang (vgl. Abbildung 5-2).

Das dritte ORF (*bacC*) besteht aus 19.080 bp. Es kodiert somit für ein 6.359 Aminosäuren großes Protein mit dem enormen Molekulargewicht von 722.943 Da. BacC setzt sich aus fünf, über C-Domänen verknüpften, AT-Minimalmodulen zusammen. Das erste Minimalmodul wird durch eine zusätzliche N-terminale C-Domäne ergänzt. Ferner werden, verknüpft mit dem zweiten und vierten Minimalmodul, E-Domänen gefunden. C-terminal des letzten

AT-Moduls befindet sich eine Te-Domäne, wie sie bei PPS-Modulen gefunden wird, die an der Termination der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt sind [Marahiel *et al.*, 1997; Schneider & Marahiel, 1998a]. Somit korreliert auch diese Domänenorganisation mit den enzymologischen Fähigkeiten der dritten Bacitracin-Synthetase BA3 (vgl. Abbildung 5-2). Dieses Enzym erweitert das von BA1 und BA2 gebildete Heptapeptid um 5 Aminosäuren und inkorporiert an der neunten und elften Position des Produktpeptides eine D-Aminosäure. Weiterhin wird durch die Bildung einer Peptidbindung zwischen der ϵ -Aminofunktion von Lys⁶ und der Carboxy-Funktion von Asn¹² die Peptidsynthese terminiert und das fertige Bacitracin vom Protein abgespalten.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die deduzierte Domänenabfolge der sequenzierten Gene *bacA-C* in perfekter Übereinstimmung mit den biochemischen Erfordernissen der Bacitracin-Synthetasen BA1-3 stehen. Da für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 keine weiteren nicht-ribosomal synthetisierten Peptide nachgewiesen wurden, kann daher gefolgert werden, daß die Gene *bacA-C* für die drei Bacitracin-Synthetasen kodieren. In verwandten bakteriellen Systemen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese, wie z. B. Gramicidin S [Krättschmar *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992], Surfactin [Cosmina *et al.*, 1993] und Tyrocidin [Mootz & Marahiel, 1997b], liegen die PPS-Gene typischerweise in Operons organisiert vor. Auch die Gene *bacA-C*, die einen Bereich von 42.886 bp umfassen, werden voneinander durch nur kurze Sequenzabschnitte getrennt (*bacA-bacB*, 112 bp; *bacB-bacC*, 105 bp). Innerhalb dieser Bereiche konnten keinerlei Terminationssignale identifiziert werden, so daß diese Gene vermutlich ebenfalls eine transkriptionelle Einheit repräsentieren [Konz *et al.*, 1997].

5.3.3 Identifizierung eines neuen PPS-Domäentyps: Die Zyklisierungs-Z-Domäne

Das auffälligste strukturelle Merkmal des Peptid-Antibiotikums Bacitracin stellt der Thiazolinring zwischen den ersten beiden Aminosäuren Ile¹ und Cys² dar (vgl. Abbildung 5-2). Biochemische Untersuchungen an der aufgereinigten Wildtyp Bacitracin-Synthetase BA1 haben gezeigt, daß dieser Ring bereits auf der Stufe des Dipeptides generiert wird [Ishihara & Shimura, 1979; Ishihara & Shimura, 1988]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene der Bacitracin-Synthetasen auf molekularer Ebene charakterisiert. Hierbei konnte zwischen den ersten beiden Modulen von BacA (BacA und BA1 werden synonym verwendet) eine ungewöhnlich Domäne identifiziert werden, die zwar Homologie zu typischen C-Domänen zeigt, jedoch insgesamt einen reduzierten Grad an Konservierung aufweist. In Datenbankvergleichen mit dieser ca. 400 Aminosäuren umfassenden Domäne wurde die höchste Verwandtschaftsbeziehung zu einer Gruppe von drei Proteinen gefunden [Gish & States, 1993]: HMWP2 aus *Yersinia enterocolitica* [Guilvout *et al.*, 1993], MTCY22H8.02 aus *Mycobacterium tuberculosis* [Philipp *et al.*, 1996] und AngR aus *Vibrio anguillarum* [Tolmasky *et al.*, 1988] (vgl. Tabelle 5-2). HMWP2 und AngR sind an der nicht-ribosomalen Biosynthese der thiazolinhaltigen Siderophore Yersiniabactin [Chambers *et al.*, 1996] bzw. Anguibactin [Jalal *et al.*, 1989] beteiligt (vgl. Abbildung 5-3(1)). MTCY22H8.02 wird in einem Genkomplex gefunden, der zusätzlich noch eine Aryl-AMP-Ligase, weitere PPS und Polyketid-Analoga enthält. Aufgrund der in diesem System gefundenen Domänenabfolge ist eine maßgebliche Beteiligung der kodierten Proteine an der nicht-ribosomalen Synthese des von *M. tuberculosis* produzierten Siderophores Exochelin bzw. Mycobactin zu erwarten

[Snow, 1970; Cole *et al.*, 1998]. Auch diese Verbindungen weisen einen fünfgliedrigen stickstoffhaltigen Heterozyklus auf. Jedoch wird in diesem Fall statt eines Schwefelatoms ein Sauerstoffatom in den Ring eingebaut, so daß die gebildete zyklische Struktur als Oxazolin bezeichnet wird. In vergleichenden Sequenzanalysen von BacA1-2, HMWP2, MTCY22H8.02 und AngR zeigte sich, daß die vier Proteine eine sehr ähnliche Domänenorganisation besitzen (vgl. Abbildung 5-3(2)). So findet man bei allen ein Kernmodul, welches sich aus einer ungewöhnlichen C-Domäne und einem AT-Minimalmodul zusammensetzt. In HMWP2 befindet sich zusätzlich als Insertion zwischen der A- und T-Domäne ein Sequenzbereich von ca. 350 Aminosäuren, der keinerlei signifikante Homologie zu bekannten Proteinen aufweist [Guilvout *et al.*, 1993]. Im N-terminalen Bereich der Kernmodule findet man bei BacA, HMWP2 und MTCY22H8.02 eine T-Domäne. Am C-Terminus wird das Kernmodul bei BacA durch klassische PPS-Module erweitert. HMWP2 besitzt in diesem Bereich eine weitere ungewöhnliche C-Domäne des gleichen Typs und nachfolgend eine zusätzliche T-Domäne. Bei MTCY22H8.02 wird hier eine putative Te-Domäne gefunden und AngR endet unmittelbar nach dem oben beschriebenen Kernmodul.

Tabelle 5-2 Prozentuale Homologie der putativen Zyklisierungs-Z-Domänen untereinander

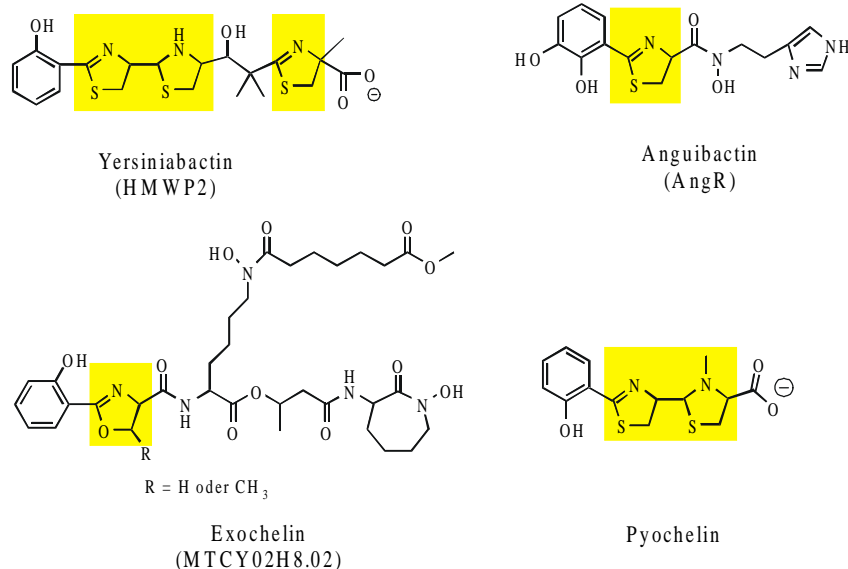
Domäne	HMWP2-1	HMWP2-2	MTCY22H8.02	AngR
BacA1-2	44 %	51 %	48 %	36 %
HMWP2-1	-	50 %	51 %	43 %
HMWP2-2		-	48 %	37 %
MTCY22H8.02			-	35 %
AngR				-

In allen bisher charakterisierten PPS-Systemen ist eine strenge Kolinearität in der Abfolge der funktionellen Domänen mit den strukturellen Eigenschaften der gebildeten Produkte gefunden worden [Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel *et al.*, 1997]. Vergleicht man nun die Domänenorganisation der hier beschriebenen Proteine mit den chemischen Strukturen der gebildeten Produkte, so zeigt sich, daß die ungewöhnlichen C-Domänen mit dem Auftreten der Heterozyklen koinzidieren. Somit kann für diesen Domärentyp eine essentielle Rolle in der Katalyse der Ringbildung postuliert werden. Aus diesem Grund werden diese Domänen im Folgenden als Zyklisierungs-Z-Domänen beschrieben [Konz *et al.*, 1997].

In weiteren Sequenzvergleichen konnte eine derartige Z-Domäne weiterhin in HMWP1 aus *Y. enterocolitica* [Pelludat *et al.*, 1998] identifiziert werden, das ebenfalls in die Biosynthese von Yersiniabactin involviert ist. Dieses Protein unterscheidet sich von den oben beschriebenen Systemen insofern, als daß es keine reine PPS darstellt, sondern zudem noch Polyketidsynthase-ähnliche Elemente enthält. Dennoch steht dieser Befund in Einklang mit den strukturellen Erfordernissen der Yersiniabactin-Synthese, da dieses Molekül in seinem C-terminalen Bereich Polyketid-ähnliche Strukturmerkmale besitzt, die ebenfalls einen Thiazolinring enthalten. Somit werden in dem Yersiniabactin-Biosynthesekomplex insgesamt drei Z-Domänen gefunden, was mit der absoluten Anzahl der in diesem Molekül enthaltenen

heterozyklischen Strukturen übereinstimmt. Weiterhin konnten in der noch nicht kompletten Genomsequenz von *Pseudomonas aeruginosa* [Pseudomonas-genome-project, 1998] partielle Sequenzabschnitte innerhalb von PPS-Systemen identifiziert werden, die ebenfalls Homologie zu Z-Domänen aufweisen. Auch *P. aeruginosa* produziert ein nicht-ribosomal synthetisiertes, thiazolinhaltiges Siderophor – Pyochelin (vgl. Abbildung 5-3(1)) [Cox, 1981; Serino *et al.*, 1997]. Daher scheint eine Beteiligung der im Rahmen dieser Sequenzvergleiche identifizierten Gene an der Pyochelin-Biosynthese als wahrscheinlich.

1



2

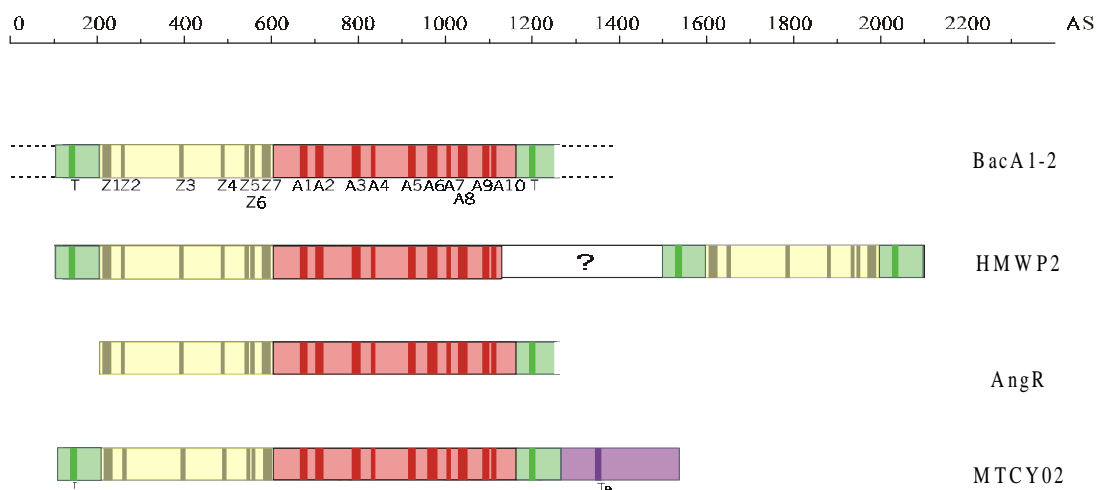


Abbildung 5-3 (1) Chemische Strukturen von nicht-ribosomal synthetisierten Siderophoren mit fünfgliedrigen Heterozyklen (gelbe Markierungen): Yersiniabactin (*Yersinia enterocolitica*), Anguibactin (*Vibrio anguillarum*), Exochelin (*Mycobacterium tuberculosis*) und Pyochelin (*Pseudomonas aeruginosa*). Die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligten Proteine, welche Homologie zu BacA aufweisen, sind unter den jeweiligen Strukturen in Klammern angegeben. (2) Vergleichende Darstellung der Domänenorganisation von BacA1-2, HMWP2, AngR und MTCY22H8.02. Der verwendete Farbkode entspricht der in Abbildung 2-5 eingeführten Definition. Die neu identifizierte Zyklisierungs-Z-Domäne ist gelb dargestellt. Die Position der innerhalb dieses Domärentyps identifizierten Core-Motive Z1-Z7 werden durch dunkle Streifen markiert.

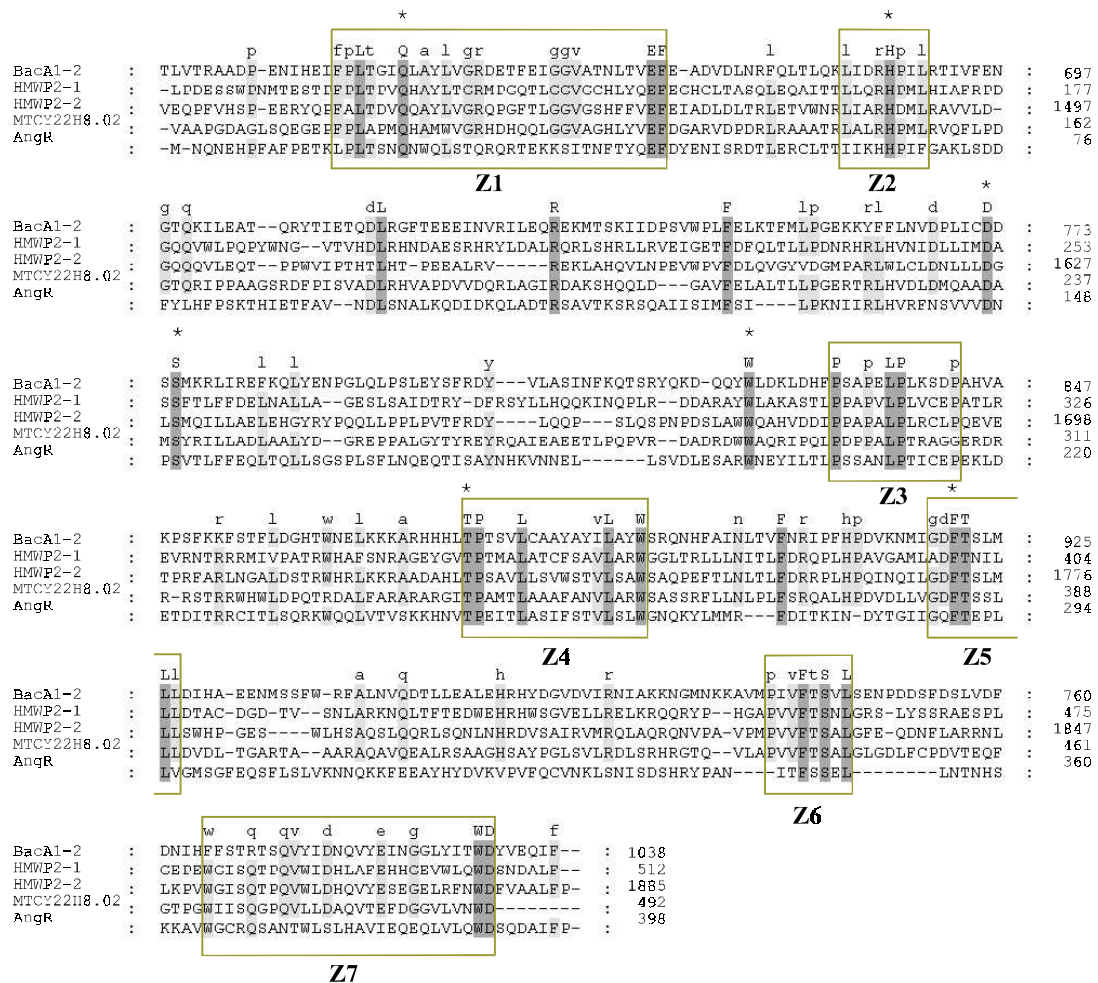


Abbildung 5-4 Sequenzalignment von fünf homologen Z-Domänen aus BA1, HMWP2, MTCY22H8.02 und AngR.. Konservierte Aminosäurereste sind farbig hervorgehoben. Durch die Kästen werden ausgedehnte Sequenzbereiche Z1-Z7 mit erhöhter Konservierung markiert. Aminosäuren, die sowohl in C- als auch Z-Domänen konserviert sind, werden durch einen Stern gekennzeichnet [Konz *et al.*, 1997].

Durch Alignments von fünf homologen Z-Domänen konnten sieben für diesen Domärentyp charakteristische, konservierte Sequenzbereiche Z1-Z7 definiert werden [Konz *et al.*, 1997]. Ferner wurden in weiterführenden Sequenzvergleichen mit C-Domänen, die ca. 25-33 % Homologie zu Z-Domänen aufweisen, insgesamt sieben Aminosäurereste identifiziert, die in beiden Domärentypen hochkonserviert vorliegen (vgl. Abbildung 5-4). Bemerkenswerter Weise gehören die His-Reste des C3-Motivs (HHIxDGS; vgl. Kapitel 2.6.3), für welche eine essentielle Rolle in der Transpeptidierungsreaktion postuliert wird [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995; Stachelhaus *et al.*, 1998], nicht zu dieser Gruppe. Vielmehr sind die Asp- und Ser-Reste dieses C3-Motivs in beiden Domärentypen anzutreffen. Dennoch kann aufgrund der Homologie beider Domärentypen und der Tatsache, daß zwischen den ersten beiden Modulen von BA1 keine weiteren Sequenzinformationen neben der Z-Domäne gefunden werden, davon ausgegangen werden, daß auch die Z-Domäne zunächst eine Transpeptidierungsreaktion katalysiert und erst im Anschluß die Ausbildung eines Thiazolin- oder Oxazolinringes erlaubt.

5.3.4 Biochemische Charakterisierung von BacA-Modulen

In der Einleitung wurde der geordnete Aufbau von PPS aus funktionellen Domänen beschrieben. Die Abfolge dieser Domänen verläuft streng kolinear mit den strukturellen Merkmalen der gebildeten Produktpeptide [Kleinkauf & von Döhren, 1996; Marahiel, 1997]. Auf dieser Basis und anhand der bekannten biochemischen Eigenschaften der Bacitracin Synthetasen BA1-3 wurde für die in dieser Arbeit charakterisierten Gene *bacA-C* postuliert, daß sie das Bacitracin Biosynthese-Operon repräsentieren. Um diese Interpretation zu verifizieren, sollten nun die ersten beiden AT-Minimalmodule aus *bacA* amplifiziert, kloniert, expremiert und bezüglich ihrer Substratspezifität untersucht werden. Ferner sollte ein Doppelmodul aus *bacA*, welches die ersten beiden AT-Minimalmodule inklusive der eingeschlossenen Z-Domäne umfaßt, analog expremiert und auf die Fähigkeit einer Peptidbildung untersucht werden (vgl. Abbildung 5-5).

5.3.4.1 Amplifikation und Klonierung der *bacA*-Fragmente

Die effiziente Überexpression eines Genes erfordert einen induzierbaren Promotor der in Abwesenheit des Induktors nicht transkribiert wird. Erst die Zugabe des Induktors soll eine starke Transkription induzieren. Die effektive Translation des Transkriptes benötigt eine starke ribosomale Bindungsstelle im optimalen Abstand zum ATG-Startkodon. Um eine Aufreinigung des überproduzierten Proteins in einem Schritt zu ermöglichen, kann das Protein mit einer Modifikation versehen werden, die die Bindung an eine Affinitätschromatographiesäule vermittelt.

Den Anforderungen entsprechend wurde für die Überexpression der *bacA*-Fragmente der Vektor pQE60 (QIAGEN) ausgewählt (vgl. Kapitel 3.4.3). Die zu den ersten beiden AT-Minimalmodulen und dem ersten Doppelmodul korrespondierenden Genfragmente von *bacA* wurden aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* über PCR amplifiziert (vgl. Abbildung 5-5). Hierzu wurden 5' -modifizierte Oligonukleotide verwendet, die die gezielte Einführung von terminalen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Nco* I (5' Primer) und *Bgl* II (3' -Primer) in die verstärkten DNA-Fragmente erlaubten (vgl. Kapitel 4.2). Die in der *Nco* I Erkennungssequenz enthaltene ATG-Basenfolge wurde dabei so positioniert, daß sie sich im selben Leseraster wie das amplifizierte *bacA*-Fragment befand und somit in einer späteren Expression als Startkodon fungieren konnte. In den Primer 5' -Ile1 wurde das native Startkodon von *bacA* in die *Nco* I Erkennungssequenz eingearbeitet. Bei dem zur Amplifikation des *bacA2*-Fragmentes verwendeten Primer 5' -Cys2 wurde die *Nco* I Schnittstelle und somit auch ein in der Originalsequenz nicht vorhandenes ATG-Startkodon 98 Aminosäuren stromaufwärts bezüglich des Core-Motives A2 (LKAG..., vgl. Abbildung 2-5) eingefügt. Die in den 3' -Primern enthaltenen *Bgl* II Erkennungssequenzen wurden beim 3' -Ile1AT-Primer 75 Aminosäuren und beim 3' -Cys2AT-Primer 65 Aminosäuren stromabwärts vom Core-Motiv T (LGGxS, vgl. Abbildung 2-5) eingefügt.

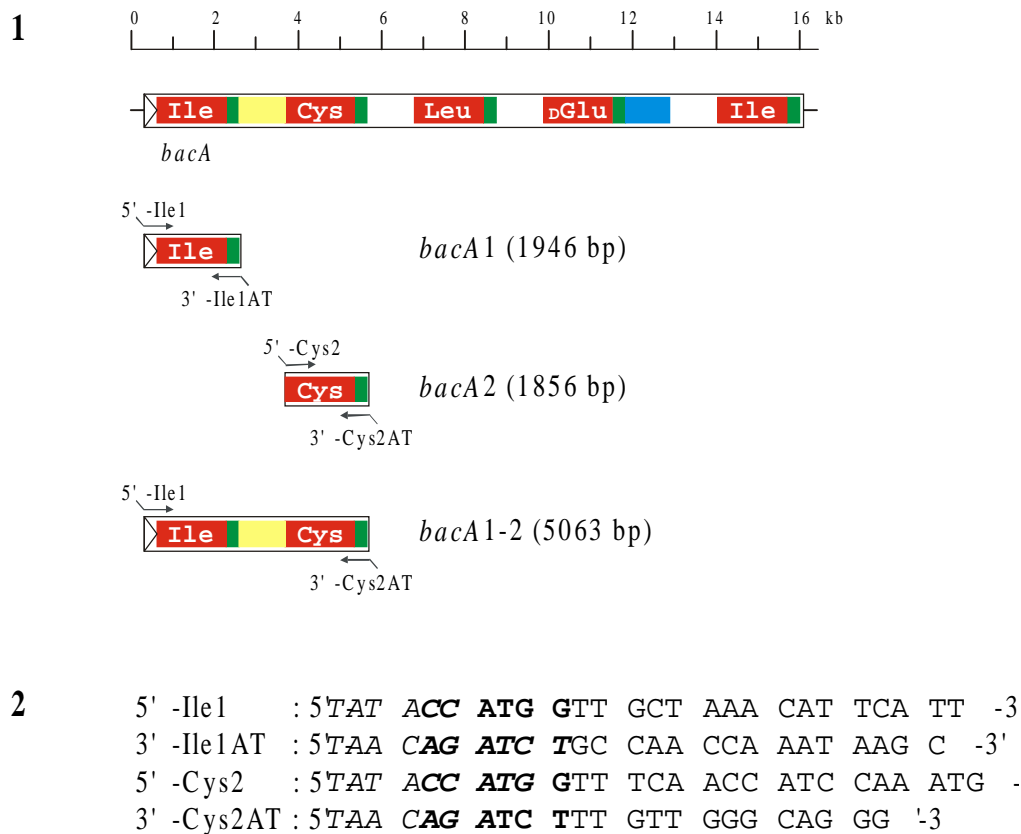


Abbildung 5-5 (1) Amplifikation der ersten beiden AT-Minimalmodule (*bacA1* und *bacA2*) sowie eines Doppelmoduls (*bacA1-2*) aus chromosomaler DNA unter Verwendung der durch die Pfeile markierten Primer. Die Größen der resultierenden DNA-Fragmente sind in Klammern angegeben. (2) Die Sequenz der verwendeten Primer ist im Bereich der nicht homologen 5'-modifizierte Anteile kursiv dargestellt. Die Position der *Nco* I- (5'-Primer) und *Bgl* II- Schnittstellen (3'-Primer) werden durch fette Buchstaben markiert.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem PCR Purification Kit (*QIAGEN*) aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Nco* I/*Bgl* II hydrolytisch gespalten und nachfolgend für eine gerichtete Ligation mit dem pQE60-Plasmidvektor eingesetzt, der zuvor ebenfalls mit *Nco* I und *Bgl* II geschnitten worden war. Durch die geeignete Positionierung der 3' -terminalen *Bgl* II Schnittstellen wurde hierdurch das offene Leseraster der klonierten *bacA*-Fragmente um sechs His-Kodone des Vektors erweitert. Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit dem Ligationsansatz wurden aus üN-Kulturen von je fünf Transformanten Plasmide isoliert. Ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Bgl* II zeigte, daß alle Plasmide die erwarteten Inserte enthielten. Für weitere Untersuchungen wurden die Plasmide pQE-BacA1-AT, pQE-BacA2-AT und pQE-BacA1-2 ausgewählt. Die Fusionsstellen zwischen dem Vektor und den klonierten *bacA*-Fragmenten dieser Plasmide wurden sequenziert. Hierzu wurden die folgenden Primer verwendet, die in der Promotor-Region (5' -Promotor) und im Bereich des Transkriptionsterminators (3' -Terminator) des pQE-Vektors hybridisieren:

5' -Promotor : 5' GGC GTA TCA CGA GGC CC-3'

3' -Terminator: 5' ACG CCC GGC GGC AAC CG-3'

Durch diese Sequenzierungen konnte für alle drei Plasmide gezeigt werden, daß sowohl die ATG-Startkodone als auch die sechs His-Kodone sich im selben Leseraster mit den klonierten *bacA*-Fragmenten befinden.

5.3.4.2 Expression und Reinigung der BacA-Fragmente

Zur Überproduktion der BacA-Proteine wurden kompetente *E. coli* M15 [pREP4] Zellen mit den Plasmiden pQE-BacA1-AT, pQE-BacA2-AT und pQE-BacA1-2 transformiert. Die Zellen wurden in 2x YT Medium mit Kan²⁵ und Amp¹⁰⁰ bei 37°C und 250 U·min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen, dann wurde die Expression der *bacA*-Genfragmente durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden Induktion hatten die Zellen eine OD₆₀₀ von ca. 1,2 erreicht. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) der Zellextrakte zum Zeitpunkt der Induktion (T₀) und zwei Stunden nach Induktion (T₂) zeigte, daß nach Induktion neue Proteinbanden sichtbar wurden, deren elektrophoretische Beweglichkeit gut mit den berechneten Molekulargewichten der Proteine BacA1-AT (73.164 Da), BacA2-AT (71.112 Da) und BacA1-2 (191.445 Da) korrelierten (vgl. Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8 Spur 2 und 3). Die nach Induktion pelletierten Zellen wurden in Puffer A resuspendiert und über eine French Press (*SLM Aminco*) aufgeschlossen. Der Überstand des Proteinextraktes wurde mit 10 % (BacA1-AT und BacA2-AT) bzw. 5 % (BacA1-2) Puffer B versetzt und auf die Ni²⁺-NTA-Säule einer FPLC-Anlage bei einer Flußrate von 1,0 mL·min⁻¹ aufgetragen. Das in Puffer B enthaltene Imidazol bindet an das Säulenmaterial und verdrängt die unspezifisch daran gebundenen Proteine.

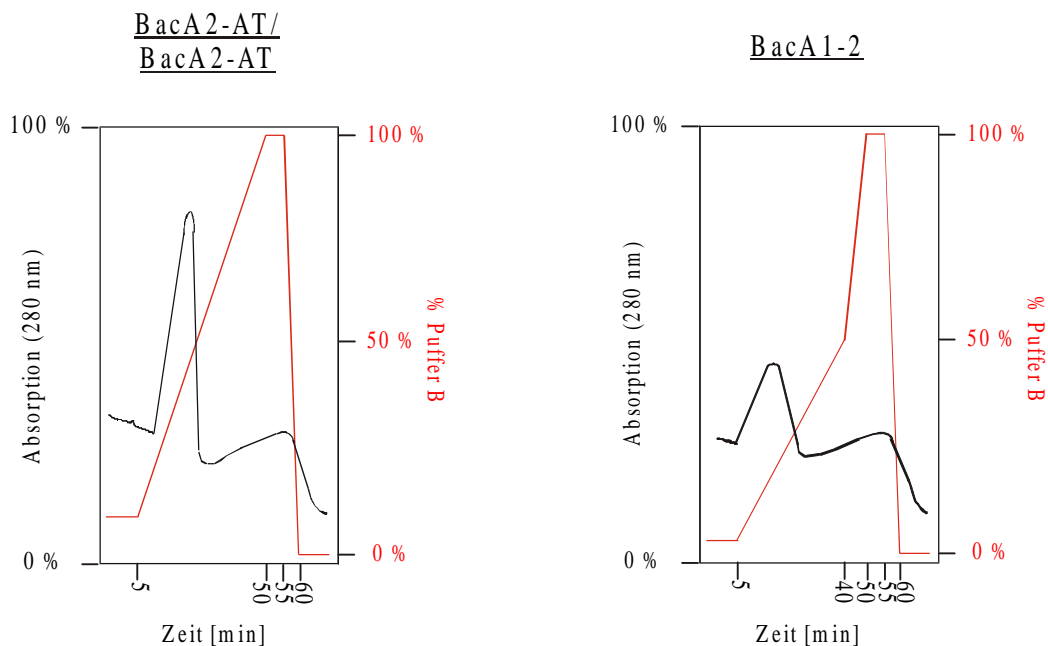


Abbildung 5-6 (1) Elutionsprofile (schwarz) der BacA-Modulproteine von einer Ni²⁺-NTA-Säule bei steigender Konzentration an Puffer B (rot).

Die Elution der Einzelmodulproteine BacA1-AT und BacA2-AT erfolgte durch das Anlegen eines Gradienten, dessen Anteil an Puffer B innerhalb von 45 min von 10 % auf 100 % anstieg. Für die Elution von BacA1-2 wurde ein zweistufiger Gradient verwendet, bei dem zunächst der Anteil an Puffer B in 35 min von 5 % auf 50 % und dann anschließend innerhalb von 10 min auf 100 % erhöht wurde. In Abbildung 5-6 sind zwei repräsentative Elutions-

profile derartiger Auftrennungen dargestellt. Der Anstieg der Absorption zeigt die Elution eines Proteins bei ca. 45 % Puffer B für die Einzelmodulproteine und bei ca. 25 % Puffer B für BacA1-2 an. Die Erhöhung der Absorption bei höheren Anteilen von Puffer B wurde durch das in Puffer B enthaltene Imidazol hervorgerufen.

Durch SDS-PAGE wurde gezeigt, daß die Fraktionen mit erhöhter Absorption gereinigte BacA-Modulproteine enthielten. In Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8 sind die Expression und Aufreinigung von BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 dargestellt. Sowohl im Gesamtzellextrakt nach Induktion (Spur 3) als auch im Überstand nach Zellaufschluß (Spur 5) nicht jedoch im Zellpellet (Spur 4), waren die Banden der BacA-Modulproteine zu erkennen. Hierdurch wurde angezeigt, daß diese Proteine in löslicher Form expremiert wurden. Durch die Bindung an die Ni^{2+} -NTA-Säule konnten sie bis zur Homogenität aufgereinigt werden (Spur 6). Für die weitere biochemische Charakterisierung dieser Proteine mußten die im Elutionspuffer enthaltenen Salze durch Dialyse gegen 50 mM Natriumphosphatlösung (pH 8,0) entfernt werden.

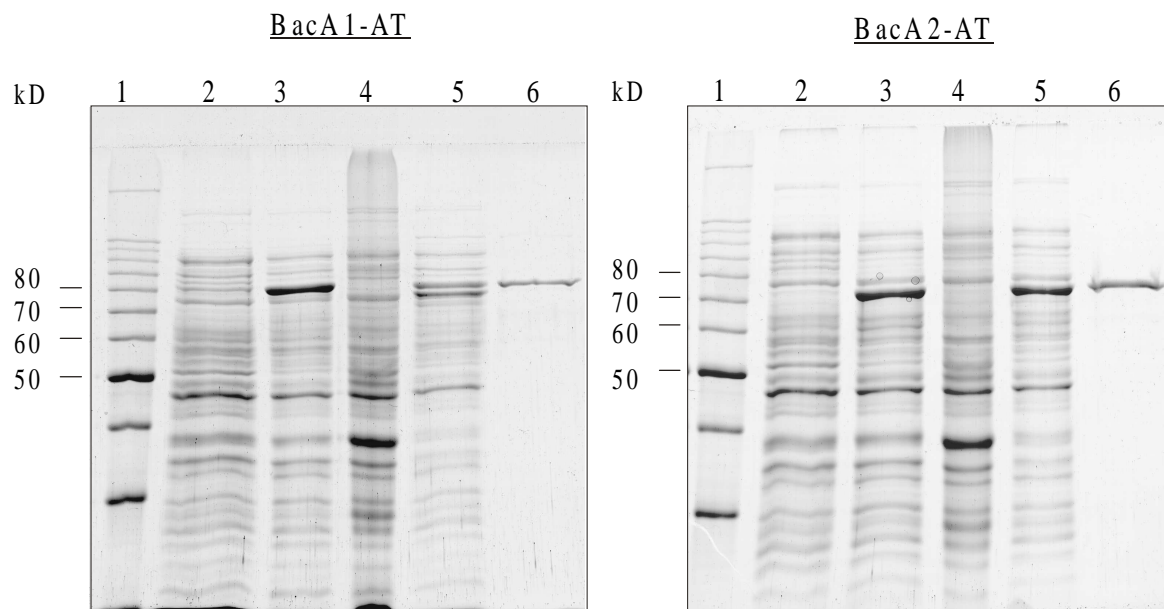


Abbildung 5-7 Coomassie Blue gefärbte SDS-PAGE. In den einzelnen Spuren sind aufgetragen: 1. Größenstandard, 2. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T_0 (unmittelbar vor IPTG-Zugabe), 3. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T_2 (2 h nach Induktion), 4. Pellet nach Zellaufschluß, 5. Überstand nach Zellaufschluß und 6.. durch Imidazol von der Ni^{2+} -NTA-Säule eluiertes BacA1-2.

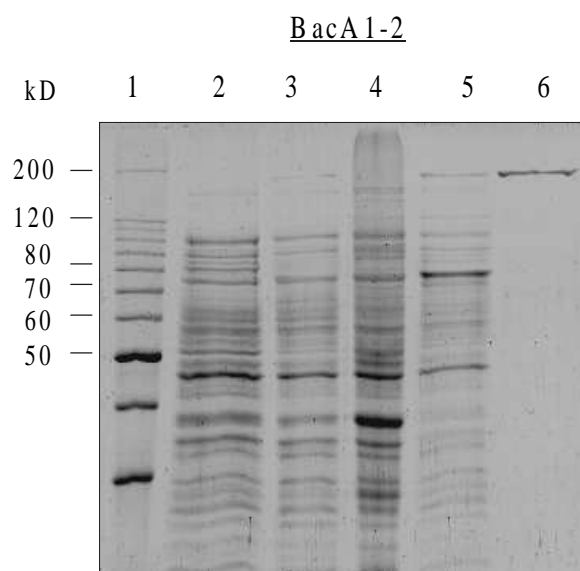


Abbildung 5-8 Coomassie Blue gefärbte SDS-PAGE. In den einzelnen Spuren sind aufgetragen: 1. Größenstandard, 2. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T_0 (unmittelbar vor IPTG-Zugabe), 3. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T_2 (2 h nach Induktion), 4. Pellet nach Zellaufschluß, 5. Überstand nach Zellaufschluß und 6.. durch Imidazol von der Ni^{2+} -NTA-Säule eluiertes BacA1-2.

5.3.4.3 ATP-PP_i-Austauschaktivität der BA1-Modulproteine

In der nicht-ribosomalen Peptidsynthese wird die Primärsequenz der gebildeten Produkte maßgeblich durch die geordnete Abfolge von A-Domänen innerhalb des jeweiligen PPS-Systems bestimmt. Diese Domänen sind verantwortlich für die selektive Erkennung und Aktivierung einer spezifischen Substrataminosäure (vgl. Kapitel 2.6.1). Die Aktivierung erfolgt hierbei durch die Bildung eines enzymassoziierten Aminoacyladenylates unter gleichzeitiger ATP-Hydrolyse [Stuhlberg & Novelli, 1960; Gevers *et al.*, 1968; Lee *et al.*, 1975]. Da diese Reaktion reversibel verläuft, kann die Rückreaktion dazu genutzt werden eine Proteinprobe *in vitro* auf ihre Aminosäure-aktivierenden Eigenschaften zu untersuchen. Setzt man einer solchen Reaktion [³²P]-Pyrophosphat zu, so wird im Zuge der Rückreaktion radioaktiv markiertes ATP generiert, welches mit Hilfe von Aktivkohle selektiv aus dem Reaktionsansatz abgetrennt werden kann. Da die Menge an gebildetem, radioaktiven ATP direkt proportional zur ATP-PP_i-Austauschrate ist, können somit Aussagen über die Aminosäure-aktivierenden Eigenschaften der untersuchten Proteinprobe getroffen werden.

Zunächst wurden zur Bestimmung der Substratspezifität die aufgereinigten BacA-Modulproteine für Aminosäure-spezifische ATP-PP_i-Austauschreaktionen eingesetzt. Hierbei wurden in parallelen Reaktionsansätzen neben ATP die zwanzig proteinogenen Aminosäuren und das in Bacitracin vorkommende Ornithin als Substrate eingesetzt. Als Negativkontrollen zur Quantifizierung unspezifischer Nebenreaktionen dienten Ansätze, die keine Aminosäure enthielten. Die in Abbildung 5-9 zusammengestellten Ergebnisse dieser Experimente belegen eindeutig, daß BacA1-AT und BacA2-AT die anhand der Primärsequenz von Bacitracin postulierten Substratspezifitäten aufweisen. So erkennt BacA1-AT spezifisch Ile wohingegen BacA2-AT selektiv Cys aktiviert. Definiert man die für jedes Protein gemessenen höchsten Aktivierungen mit 100 %, so war der gemessene Hintergrund der Kontrollreaktionen ohne Aminosäure kleiner als 1 %. Für BacA1-AT wurden schwache Nebenpräferenzen für die

hydrophoben Aminosäuren Leu (4,5 %), Phe (4 %) und Val (3 %) gefunden, während die Aktivierungen der übrigen Aminosäuren sich in der Größenordnung der Negativkontrolle bewegten ($< 1\%$). Für BacA2-AT konnten keinerlei Nebenspezifitäten detektiert werden. Die für BacA1-2 ermittelten Austauschaktivitäten spiegeln in perfekter Korrelation die Eigenschaften der beiden Einzelmodule wider. Diese Daten belegen somit die Hypothese, daß *bacA* für die Bacitracin-Synthetase BA1 kodiert und es kann geschlossen werden, daß *bacB* und *bacC* die Strukturgene von BA2 und BA3 repräsentieren. Weitere Beweise hierfür konnten mittlerweile in Zusammenarbeit mit Frau Andrea Klens durch die Konstruktion einer *bacB*-Unterbrechungsmutante erbracht werden, die einen Bacitracin negativen Phänotyp aufwies [Konz *et al.*, 1997].

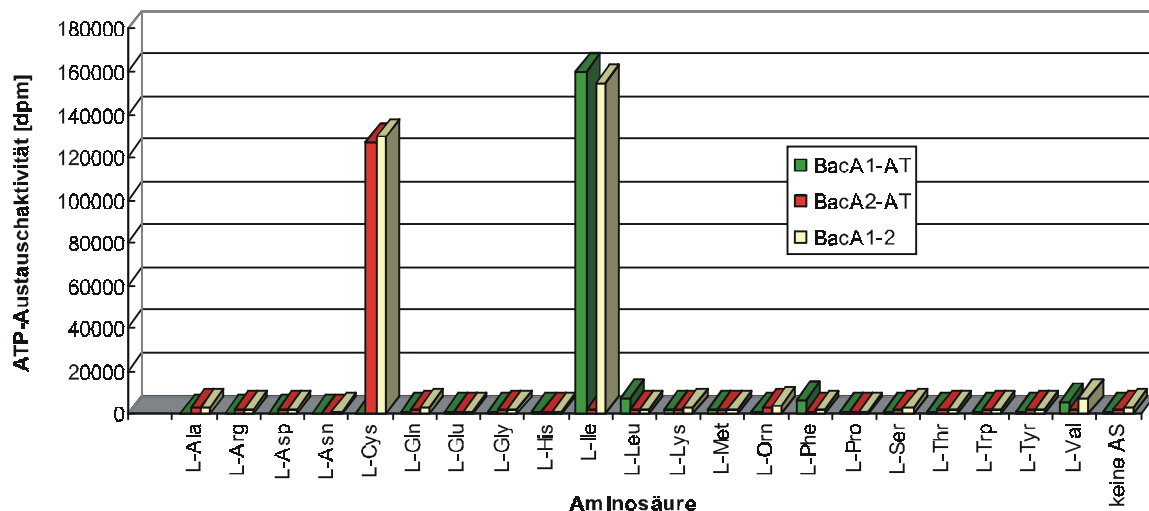


Abbildung 5-9 Ergebnisse der Aminosäure-abhängigen ATP-PP_i-Austauschreaktionen.

Zur Quantifizierung der Substratspezifität der BacA-Modulproteine wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten (K_d) von ATP und den Substrataminosäuren (Ile bzw. Cys) ermittelt. Da es sich bei der Bildung eines Aminoacyladenylates um eine bimolekulare Reaktion handelt, mußten die kinetischen Konstanten in Abhängigkeit des jeweils komplementären Reaktionspartners ermittelt werden [Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1995]. Zur Bestimmung der Aminosäure-Dissoziationskonstanten ($K_d(AS)$) wurden also in je vier Meßreihen von ATP-PP_i-Austauschreaktionen die Aminosäurekonzentrationen bei vier konstanten ATP-Konzentrationen variiert. Die resultierenden Meßwerte wurden dann für eine Hanes-Analyse eingesetzt [Hanes, 1932; Cornish-Bowden, 1995]. Wie in Abbildung 5-10 exemplarisch für BacA1-AT dargestellt, schneiden die Geraden dieser reziproken Auftragung sich hierbei jeweils in einem Punkt, dessen Abzissenabschnitt den Wert für $-1/K_d$ angibt. In analoger Weise konnten durch Variation der ATP-Konzentrationen bei konstanten Aminosäurekonzentrationen die Dissoziationskonstanten für ATP ($K_d(ATP)$) ermittelt werden (vgl. Abbildung 5-11). In Tabelle 5-3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt.

Tabelle 5-3 Dissoziationskonstanten der BacA-Modulproteine

Protein	Substrat-AS	$K_d(\text{AS})$ [mM]	$K_d(\text{ATP})$ [mM]
BacA1	L-Ile	$0,75 \pm 0,15$	$1,5 \pm 0,3$
BacA1-2	L-Ile	$0,72 \pm 0,12$	$1,4 \pm 0,3$
BacA2	L-Cys	$1,56 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,5$
BacA1-2	L-Cys	$1,68 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,4$

Die signifikante Übereinstimmung der Bindungsaffinitäten der spezifischen A-Domänen in den Einzelmodul- und Doppelmodulproteinen sowie die gute Korrelation zu Daten, die in Untersuchungen an den Wildtyp Proteinen TycA und GrsA erhalten wurden [Kittelberger *et al.*, 1982; Gocht & Marahiel, 1994], spiegeln die funktionelle Eigenständigkeit der A-Domänen in PPS wider.

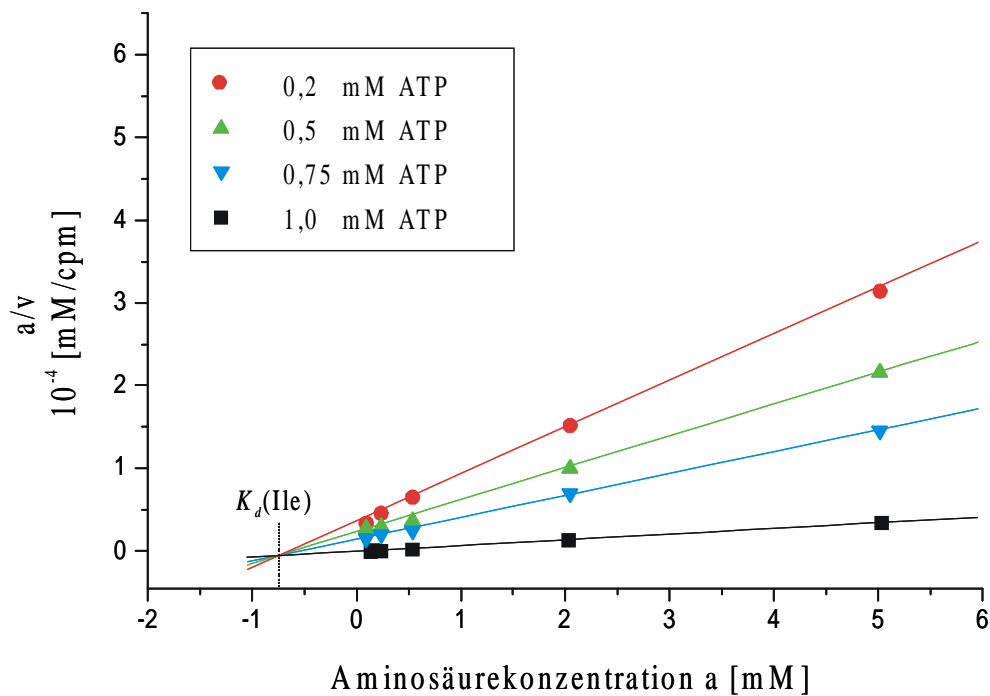


Abbildung 5-10 Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_d(\text{Ile})$ für BacA1-AT. Reziproke Auftragung der ATP-PP_i-Austauschaktivitäten für verschiedene ATP-Konzentrationen in Abhängigkeit der Ile-Konzentration.

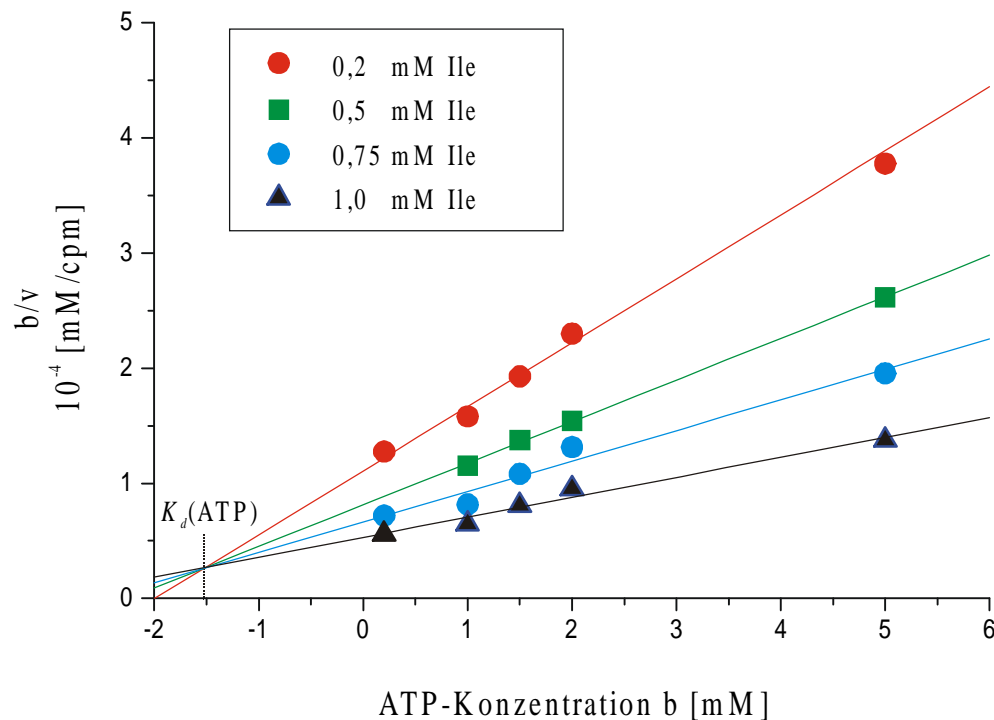


Abbildung 5-11 Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_d(\text{ATP})$ für BacA1-AT. Reziproke Auftragung der ATP-PP_i-Austauschaktivitäten für verschiedene Ile-Konzentrationen in Abhängigkeit der ATP-Konzentration.

5.3.4.4 Posttranslationale Modifikation der BA1-Modulproteine mit 4' -PAN

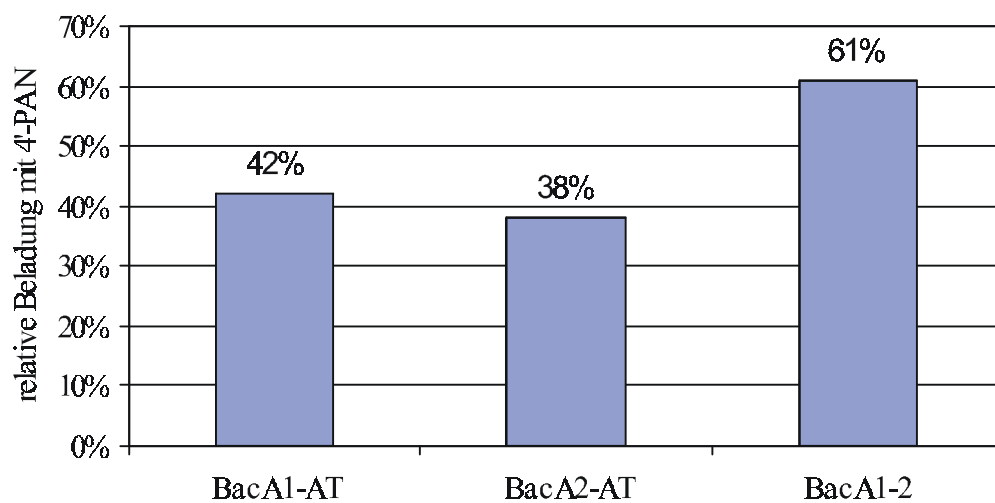
Die nachfolgend beschriebenen Experimente (Kapitel 5.3.4.4 und 5.3.4.5 sowie teilweise 5.3.4.6) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Paul H. Weinreb in der Arbeitsgruppe von Prof. Chris T. Walsh an der Harvard Medical School (Boston, USA) durchgeführt.

In der nicht-ribosomalen Peptidsynthese werden die als Aminoacyladenylat aktivierten Substratamino-säuren als Thioester auf 4' -PAN-Kofaktoren übertragen, die kovalent mit den T-Domänen von PPS verknüpft sind. Die Beladung der T-Domänen mit diesen 4' -PAN-Kofaktoren erfolgt in einer posttranslationalen Modifikationsreaktion, die durch die kürzlich identifizierte Superfamilie der 4' -PAN-Transferasen katalysiert wird [Lambalot *et al.*, 1996]. Diese Enzyme übertragen den Phosphopantetheinanteil von CoA auf eine in allen T-Domänen hochkonservierte Serinseitenkette (vgl. Abbildung 2-7). Die für die Expression der BacA-Modulproteine verwendeten *E. coli* Zellen synthetisieren keine 4' -PAN-Transferase, die *Bacillus*-PPS-Module effektiv modifizieren kann. Daher mußten die aufgereinigten BacA-Modulproteine nachträglich *in vitro* modifiziert werden. Hierzu wurde das Protein Sfp aus *B. subtilis* verwendet, das freundlicherweise von Dr. Weinreb zur Verfügung gestellt wurde [Quadri *et al.*, 1998]. Zur Quantifizierung der Modifikationsreaktion wurden die BacA-Modulproteine in Gegenwart von Sfp mit [³H]-CoA inkubiert und anschließend über eine TCA-Behandlung präzipitiert. Über die Quantifizierung der mit dem Protein gefällten Radioaktivität konnte nun der Anteil von kovalent mit dem Enzym verknüpften 4' -PAN ermittelt werden.

Die in Abbildung 5-12 dargestellten Resultate dieser Untersuchungen zeigen, daß Sfp die Einzelmodulproteine BacA1-AT und BacA2-AT zu ca. 40 % mit 4' -PAN modifiziert. Werden diese Ergebnisse auf das Doppelmodulprotein projiziert, so kann postuliert werden, daß auch

hier beide in dem Protein enthaltenen T-Domänen zu ca. 40 % mit 4' -PAN beladen werden. Dabei gilt es jedoch zu beachten, daß mit BacA1-2 insgesamt drei verschiedene Reaktionsprodukte zu erwarten sind, bei denen die erste, die zweite oder beide T-Domänen einen 4' -PAN-Kofaktor tragen können (vgl. Abbildung 5-12(2)). Somit kann postuliert werden, daß von den 40 % der BacA1-2 Proteine, die einen Kofaktor an ihrer ersten T-Domäne tragen, zusätzlich 40 % an ihrer zweiten T-Domäne modifiziert sind. Daraus ergibt sich für diese Variante mit einer zweifachen 4' -PAN-Beladung insgesamt eine Wahrscheinlichkeit von ca. 16 %. Dagegen treten die beiden einfach modifizierten Varianten mit einer 24 %igen Wahrscheinlichkeit auf. Zusammenfassend läßt sich also eine absolute Beladungseffizienz des Doppelmodulproteins BacA1-2 von ca. 64 % erwarten, was sehr gut mit dem experimentell ermittelten Wert von 61 % korreliert.

1



2

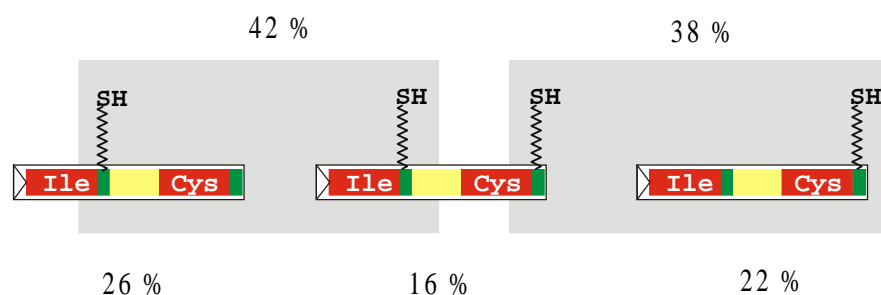


Abbildung 5-12 (1) Prozentuale Beladung der BacA-Modulproteine nach Inkubation mit Sfp und [^3H]-CoA. (2) Schematische Darstellung der drei möglichen Reaktionsprodukte bei einer posttranslationalen Modifikation von BacA1-2 mit 4' -PAN. Die oberen Prozentangaben und die grauen Boxen geben den Modifikationsgrad bezüglich der ersten und der zweiten T-Domäne an. Durch die unteren Prozentangaben wird die zu erwartende Produktverteilung angegeben.

5.3.4.5 Kovalente Beladung der BacA-Modulproteine mit [^{12}C]-Ile und [^{35}S]-Cys

Im vorangegangenen Abschnitt konnte die posttranslationale Modifikation der BacA-Modulproteine mit 4' -PAN durch Sfp nachgewiesen werden. Damit konnte im folgenden die Fähig-

keit dieser Proteine untersucht werden, ihre als Aminoacyladenylat aktivierten Substrat-aminosäuren kovalent als Thioester zu binden. Hierzu wurden die zuvor mit nicht radioaktiv markiertem 4' -PAN modifizierten Proteine in Gegenwart von ATP mit $[^{14}\text{C}]$ -Ile bzw. $[^{35}\text{S}]$ -Cys inkubiert. Eine anschließende Fällung mit TCA führte dann zu einer Kopräzipitation der kovalent gebundenen Aminosäuren, während die freie Aminosäure ausgewaschen werden konnte. Zur Kontrolle, daß die präzipitierte Radioaktivität tatsächlich kovalent mit den jeweiligen Proteinen verknüpft war, wurden die Präzipitate von BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 nach Beladung mit $[^{14}\text{C}]$ -Ile und $[^{35}\text{S}]$ -Cys elektrophoretisch auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend autoradiographiert (vgl. Abbildung 5-13). Hierdurch konnte eindeutig gezeigt werden, daß die drei Proteine ihre Substrataminosäuren als Thioester binden.

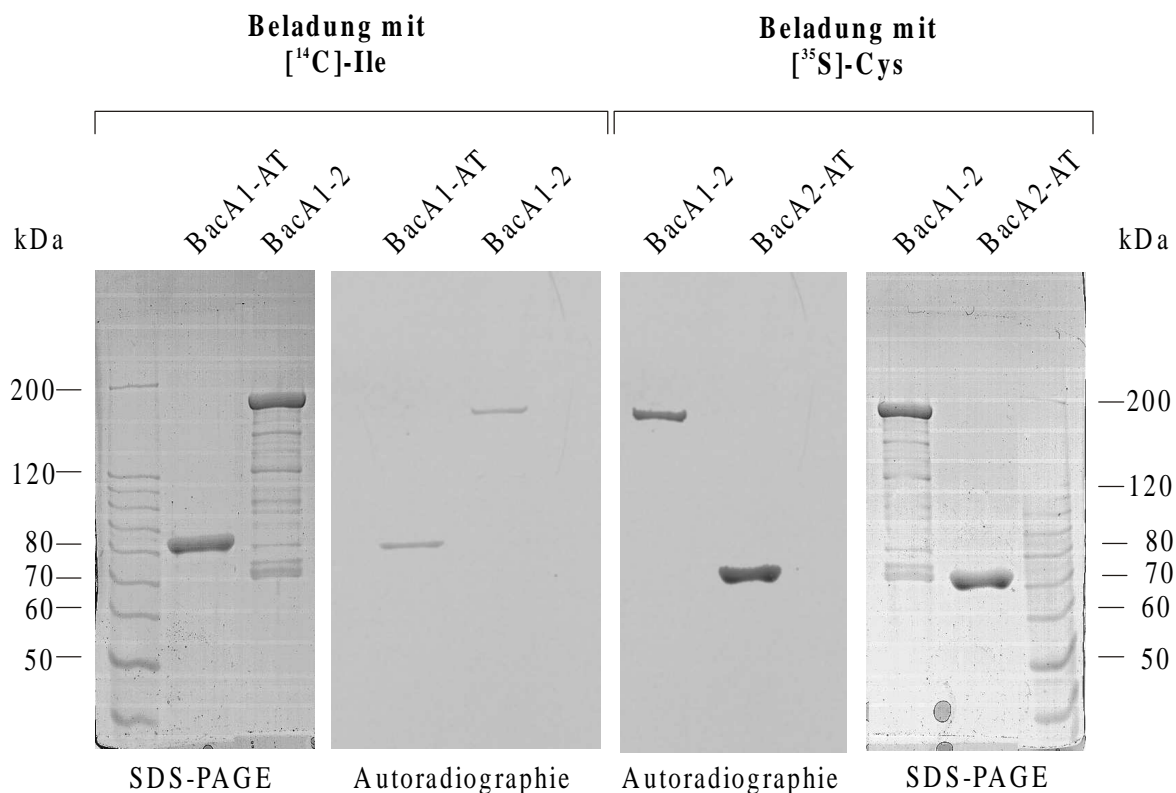


Abbildung 5-13 Coomassie Blue gefärbte SDS-PAGE und korrespondierende Autoradiographie von BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 nach Beladung mit radioaktiv markierten Aminosäuren.

Tabelle 5-4 Kovalente Beladung der BacA-Modulproteine mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Protein	Substrat-Aminosäure	Beladung (absolut)	Beladung relativ zu 4'-PAN-Beladung
BacA1	[¹⁴ C]-L-Ile	38 %	91 %
BacA1-2	[¹⁴ C]-L-Ile	35 %	89 %
BacA2	[³⁵ S]-L-Cys	32 %	85 %
BacA1-2	[³⁵ S]-L-Cys	30 %	83 %

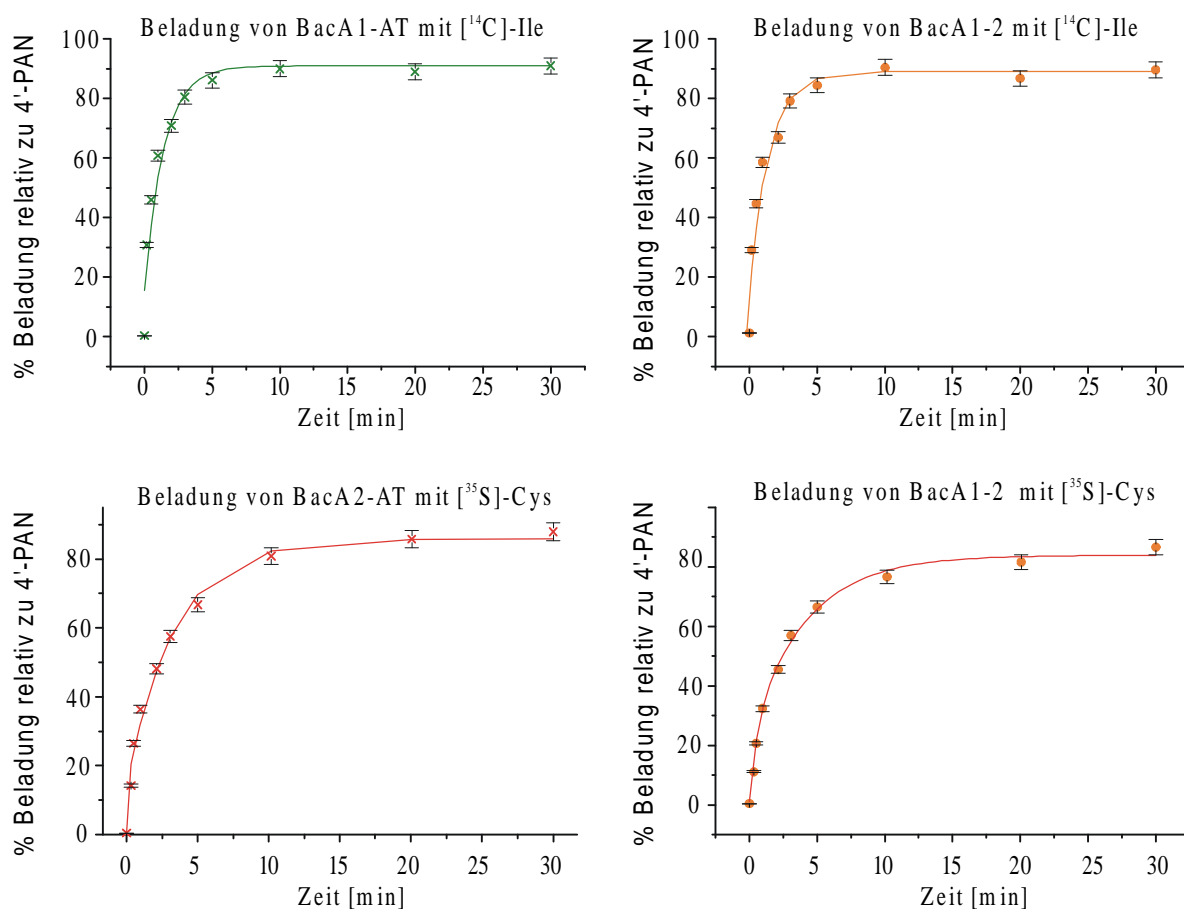


Abbildung 5-14 Zeitabhängige Messungen zur Beladung der BacA-Modulproteine mit ihren radioaktiv markierten Substrataminosäuren.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Tabelle 5-4 sowie in Abbildung 5-14 zusammengestellt. Diese Daten dokumentieren, daß sich die Einzel- und Doppelmodulproteine nahezu identisch verhalten und belegen somit abermals die funktionelle Eigenständigkeit der hier analysierten Domänen. Da nur posttranslational modifizierte Enzyme die aktivierten Aminosäuren als Thioester binden können, wurden die experimentell ermittelten Werte in Relation zu den Beladungswerten mit 4'-PAN gesetzt. Hierbei zeigte sich, daß die BacA-Modulproteine eine hohe Thiolierungseffizienz (83-91 %) aufweisen. Unter Berücksichtigung der inhärenten Meßungenauigkeit des angewendeten Verfahrens kann sogar von einer noch höheren Beladung und somit einer nahezu quantitativ verlaufenden Reaktion ausgegangen

werden. Auch die zeitabhängigen Messungen der Thioesterbindung belegen die hohe Effizienz dieser Reaktion (vgl. Abbildung 5-14). So erreichen die Proteine bereits nach weniger als einer Minute ihren halbmaximalen Beladungswert. Im Fall von Ile (BacA1-AT und BacA1-2) ist die Reaktion nach ca. fünf Minuten und bei Cys (BacA2-AT und BacA1-2) nach ca. zehn Minuten zu über 95 % abgeschlossen.

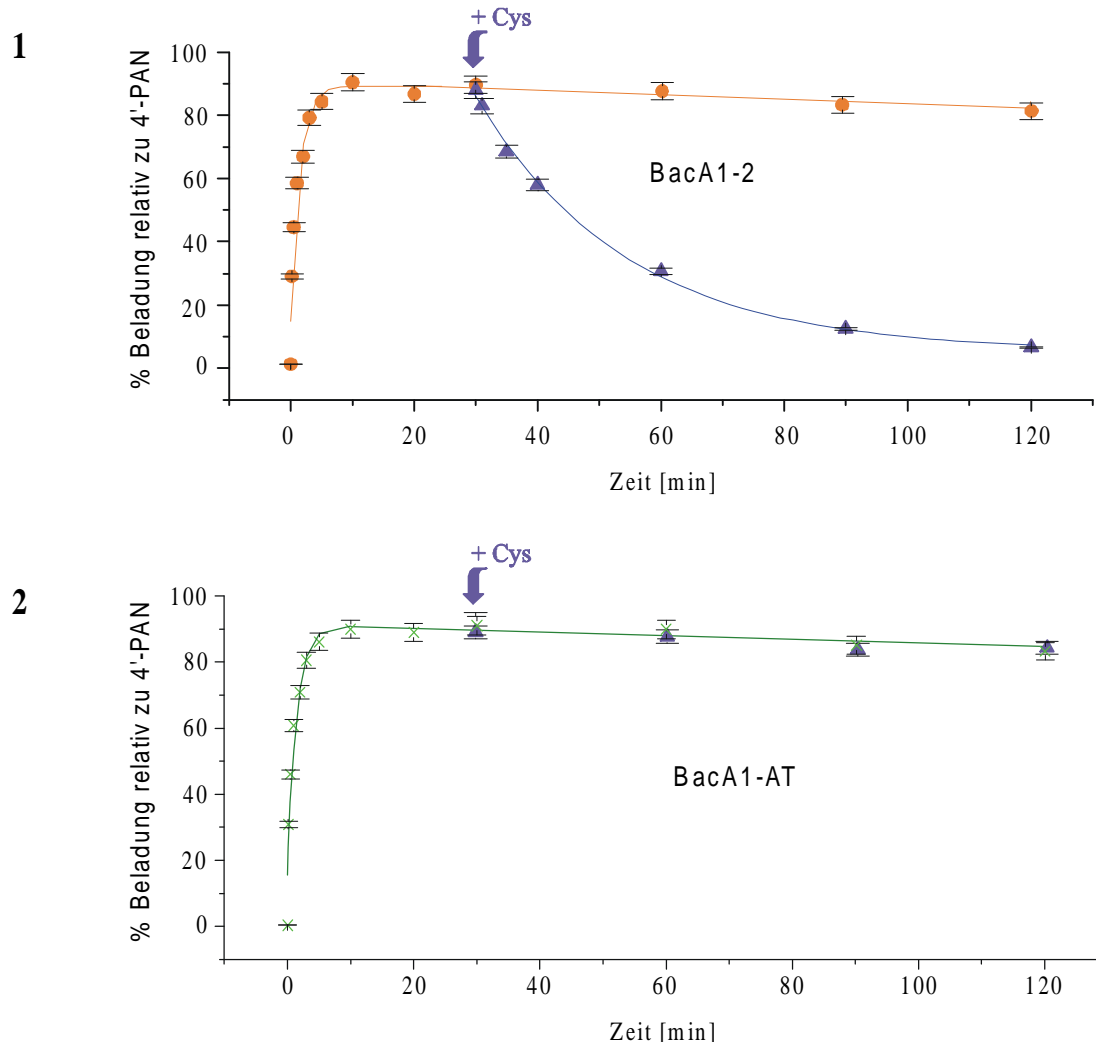


Abbildung 5-15 (1) Beladung von BacA1-2 mit $[^{14}\text{C}]$ -Ile in Abwesenheit (orange) und in Gegenwart von Cys (violett). Durch den violetten Pfeil wird der Zeitpunkt der Cys-Zugabe markiert. (2) Beladung von BacA1-AT in Abwesenheit (grün) und in Gegenwart von Cys (violette Meßpunkte). Auch hier wird der Zeitpunkt der Cys-Zugabe durch den violetten Pfeil markiert.

Nach der Bindung als Thioester werden die Substrataminosäuren in der nicht-ribosomalen Peptidsynthese in einer geordneten Sequenz von Transpeptidierungsschritten bis hin zum fertigen Produktpeptid verknüpft. Die dabei intermediär auftretenden Peptidzwischenstufen liegen ebenfalls als Thioester kovalent enzymgebunden vor. Infolge dieser Kondensationsreaktionen werden sukzessiv die zunächst beladenen T-Domänen wieder freigesetzt und stehen somit erneut für eine Beladung mit ihren spezifischen Substrataminosäuren zur Verfügung. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, sollte nun die Ile-Beladung von BacA1-2 in Gegenwart von Cys näher analysiert werden. Dazu wurde BacA1-2 zunächst für 30 Minuten mit ATP und $[^{14}\text{C}]$ -Ile inkubiert und anschließend mit einem großen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Cys versetzt. In Abbildung 5-15 sind die Ergebnisse dieser Unter-

suchungen dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß durch den Zusatz von Cys eine rasche Abnahme der [^{14}C]-Ile Beladung induziert wurde. In einem Kontrollexperiment, in dem das Einzelmodulprotein BacA1-AT unter entsprechenden Bedingungen inkubiert wurde, konnte dagegen keine derartig induzierte Abnahme der enzymgebundenen Radioaktivität durch eine Zugabe von Cys beobachtet werden. Somit kann der bei BacA1-2 beobachtete Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine katalysierte Umsetzung der beiden Substrataminosäuren zurückgeführt werden.

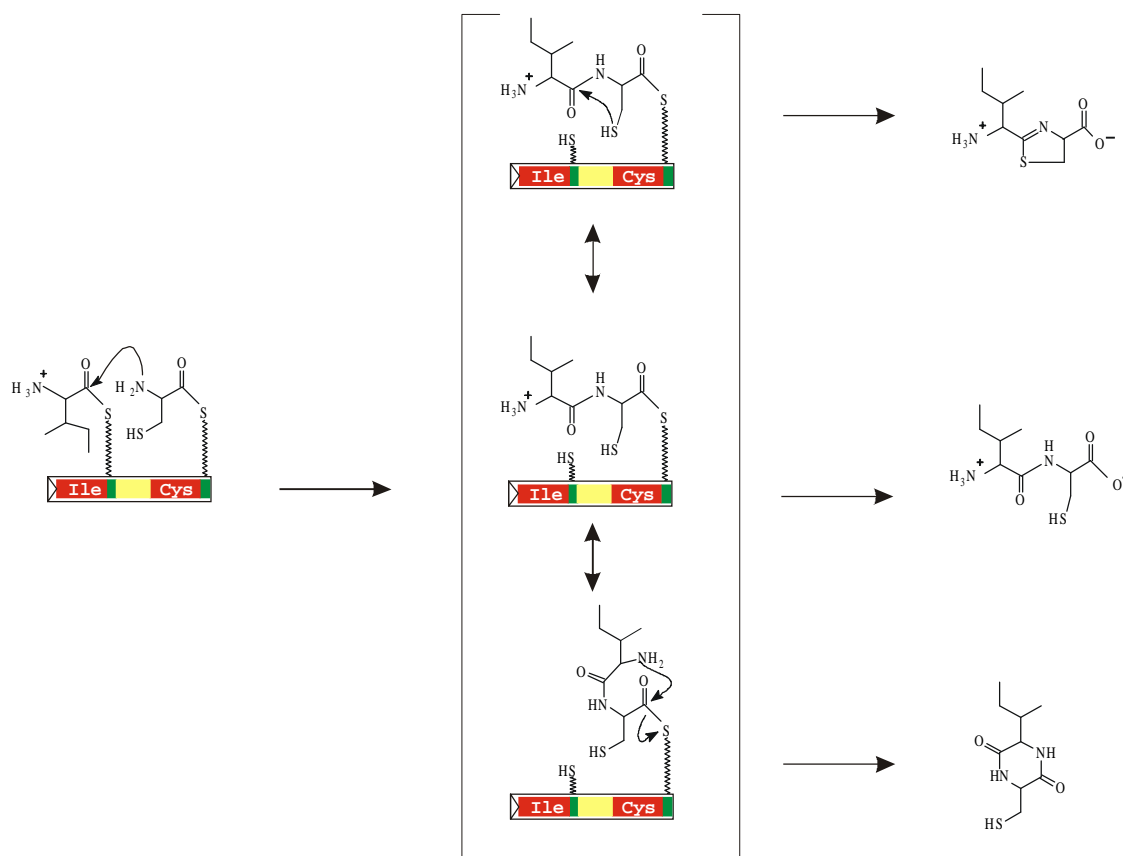


Abbildung 5-16 Modell der Cys-induzierten Abnahme der [^{14}C]-Ile Beladung von BacA1-2 (vgl. Text).

Diese Daten führten zur Formulierung des in Abbildung 5-16 dargestellten Modells. Demzufolge wird BacA1-2 zunächst nacheinander mit den beiden Substrataminosäuren Ile und Cys beladen, welche dann in einem katalysierten Folgeschritt zum enzymgebundenen Dipeptid kondensieren. Dieses Dipeptid kann nun durch die Ausbildung eines Diketopiperazins oder nach einer etwaigen Thiazolinringbildung durch eine unkatalysierte hydrolytische Thioesterspaltung vom Enzym abgetrennt werden. Da die resultierenden potentiellen Reaktionsprodukte nicht mehr als Substrate von den BacA1-2 A-Domänen erkannt werden, kann keine erneute Beladung des Enzyms mit diesen Verbindungen erfolgen. Hieraus erklärt sich die experimentell beobachtete Abnahme an enzymgebundener Radioaktivität. Ähnliche Beobachtungen wurden auch vor kurzem an einem PPS-Dimodulsystem berichtet, das sich aus GrsA und einem TycB1-Modulprotein 'ProCAT' (bestehend aus C-, A- und T-Domäne) zusammensetzt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Auch hier wurde durch die Zugabe der zweiten

Substrataminosäure eine Abnahme der Beladung bezüglich der ersten Aminosäure gemessen (vgl. Kapitel 6.2.2).

5.3.4.6 Analyse der Reaktionsprodukte des BacA1-2-Doppelmodulproteins

Abschließend sollte untersucht werden, welche Reaktionsprodukte in Gegenwart von Ile und Cys durch BacA1-2 gebildet werden. Zu diesem Zweck wurde BacA1-2 zunächst entweder mit [^{14}C]-Ile oder mit [^{35}S]-Cys beladen und dann im Überschuß mit der komplementären, nicht radioaktiv markierten Aminosäure versetzt. Nach zwei Stunden Inkubation konnten dann die Reaktionsprodukte mit n-Butanol aus dem Reaktionsansatz extrahiert und zur chromatographischen Analyse eingesetzt werden (s. u.). Um darüber hinaus die enzymgebundenen Reaktionsprodukte zu untersuchen, wurden weitere Reaktionen bereits zwei bis fünf Minuten nach Zugabe der nicht radioaktiven Aminosäure mit TCA gestoppt und die Proteine präzipitiert. Die kovalent als Thioester mit den gefällten Proteinen verknüpften Aminosäuren sowie mögliche Reaktionsprodukte wurden dann durch eine Perameisensäure- oder Basenbehandlung freigesetzt. Diese Spaltprodukte konnten nun zusammen mit den butanolischen Extrakten auf eine DC-Platte (Cellulose-Fertigplatten, *Merck*) aufgetragen und in einem spezifischen Solventgemisch entwickelt werden. Durch eine anschließende Autoradiographie der getrockneten DC-Platte war es möglich die aufgetrennten Spaltprodukte zu detektieren. Die in Abbildung 5-17 dargestellte DC-Platte und die korrespondierende Autoradiographie (Spur 5-9) zeigen, daß unabhängig von der verwendeten, radioaktiv markierten Aminosäure ein einheitliches Produkt entsteht (Spur 5-8), welches somit die beiden Aminosäuren Ile und Cys enthalten muß. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser Verbindung zeigt im Vergleich zu einem ebenfalls analysierten Standard, daß es sich hierbei um lineares Ile-Cys Dipeptid handelt (Spur 3). Diese Interpretation wird weiterhin durch die Beobachtung unterstützt, daß durch eine oxidative Thioesterspaltung ein Produkt (Spur 9) erhalten wird, welches dasselbe Laufverhalten wie der mit Perameisensäure behandelte lineare Ile-Cys Dipeptidstandard (Spur 12) aufweist. Dieses Verhalten ist auf eine durch Perameisensäure induzierte Oxidation von Thiolgruppen zurückzuführen. Die dabei entstehende Sulfonsäure vermittelt dem Produkt einen polarereren Charakter als die Ausgangsverbindungen, so daß sie auf der DC langsamer mit dem hydrophoben Laufmittel wandert. Dieser Effekt ist auf der abgebildeten DC gut an dem Cys- und lin. Ile-Cys-Standard zu beobachten.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden präparative Reaktionsansätze mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführt, deren butanolische Extrakte im Anschluß über *Reversed Phase* HPLC analysiert wurden. Auch hierbei konnte, wie in Abbildung 5-18 dargestellt, zweifelsfrei die durch BacA1-2 katalysierte Bildung von linearem Ile-Cys Dipeptid nachgewiesen werden. Die zusätzlich detektierten Elutionssignale bei 17,5 min sowohl in der Analyse des Ile-Cys Standards als auch bei den butanolischen Reaktionsextrakten sind auf eine Dimerisierung des Dipeptides unter Ausbildung einer Disulfidbindung zurückzuführen. Diese Daten belegen daher eindeutig die Fähigkeit des BacA1-2 Doppelmodulproteins, seine beiden Substrataminosäuren kovalent über eine Peptidbindung miteinander zu verknüpfen. Damit repräsentiert das hier analysierte BacA1-2 Protein das erste Beispiel eines heterolog expremierten PPS-Doppelmodulproteins, dessen funktionelle Aktivität in Bezug auf seine Adenylierungs-, Thiolierungs- und Kondensationseigenschaften nachgewiesen werden konnte.

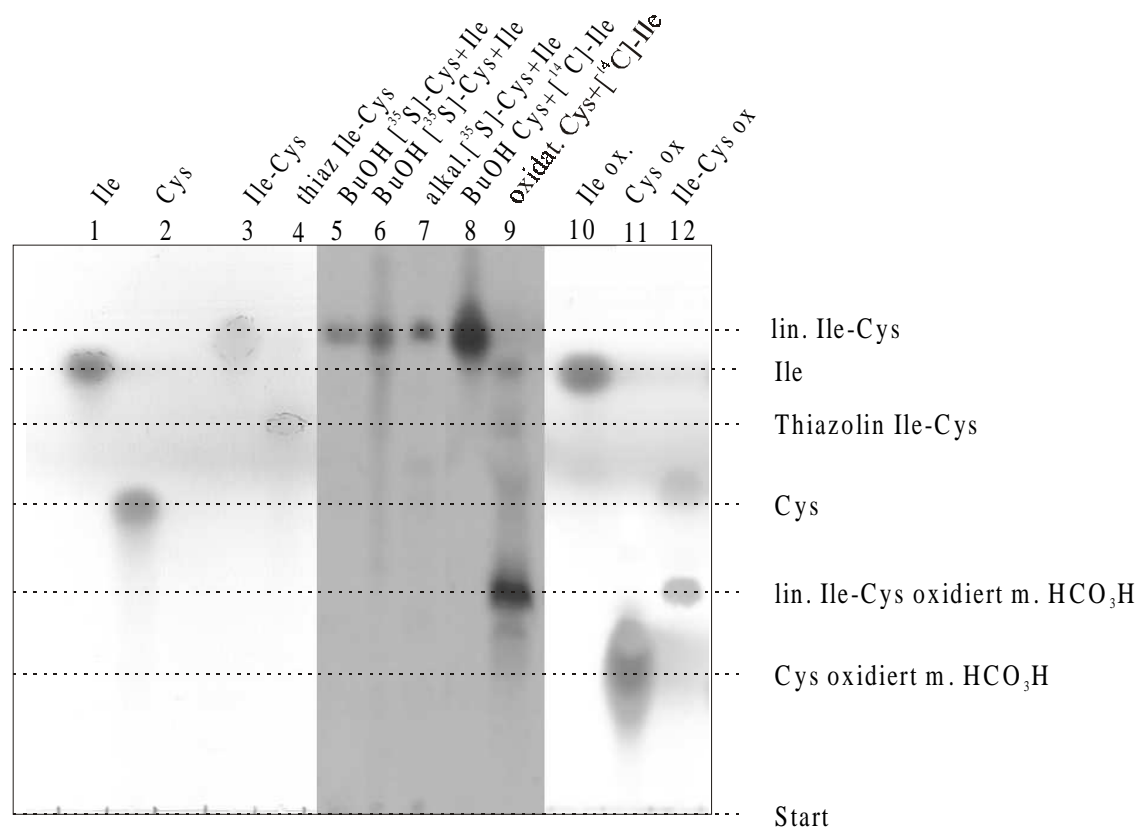


Abbildung 5-17 DC-Analyse der Reaktionsprodukte von BacA1-2. Die Spuren 1-4 und 10-12 stellen die mit Ninhydrin angefärbte DC-Platte dar, wohingegen für die Spuren 5-9 die korrespondierende Autoradiographie abgebildet ist. In den einzelnen Spuren wurde aufgetragen: 1) Ile-Standard, 2) Cys-Standard, 3) linearer Ile-Cys-Standard, 4) Thiazolin-Ile-Cys-Standard, 5) butanolischer Extrakt einer Reaktion mit Ile und [^{35}S]-Cys, 6) wie 5 jedoch doppelte Menge aufgetragen, 7) alkalische Thioesterspaltung einer Reaktion mit Ile und [^{35}S]-Cys, 8) butanolischer Extrakt einer Reaktion mit [^{14}C]-Ile und Cys, 9) oxidative Thioesterspaltung einer Reaktion mit [^{14}C]-Ile und Cys, 10-12) mit Perameisensäure behandelte Standards 10) Ile, 11) Cys und 12) Ile-Cys.

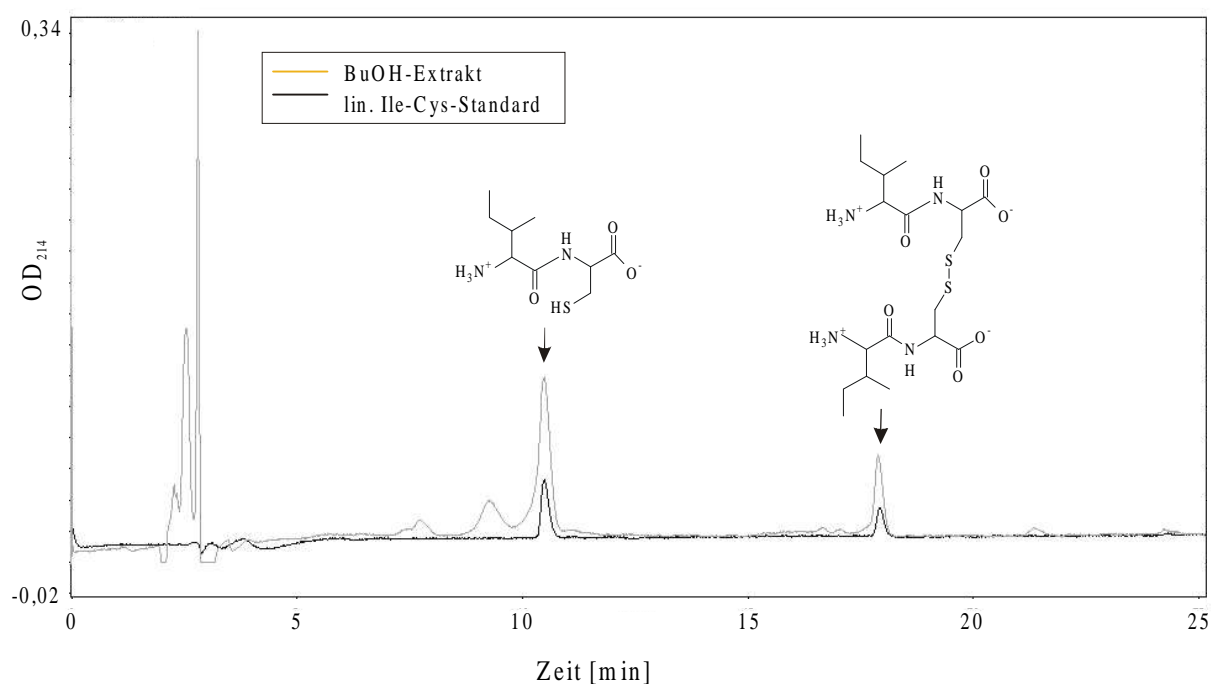


Abbildung 5-18 Elutionsprofil einer Reversed Phase HPLC-Analyse von linearem Ile-Cys Dipeptidstandard (schwarz) und von butanolischen Extrakten präparativer Reaktionsansätze (ocker).

5.4 Charakterisierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons

Mit Hilfe der in Kapitel 5.1 beschriebenen PPS-spezifischen PCR-Methode wurden zwei PCR-Fragmente (PCR01 und PCR05) aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* amplifiziert, deren DNA-Sequenz Homologie zu PPS-Genen aufwies. Durch ein gezieltes Genbank-Screening unter Verwendung des PCR05-Fragmentes als Sonde, konnte wie zuvor beschrieben das gesamte Bacitracin Biosynthese-Operon kloniert und sequenziert werden. Innerhalb der ermittelten *bac*-Sequenz konnte jedoch keine mit dem PCR01-Fragment identische Region identifiziert werden. Daher mußte davon ausgegangen werden, daß der untersuchte *B. licheniformis* Stamm zumindest ein weiteres PPS-Gen besitzt.

5.4.1 Klonierung und Sequenzierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons

Zur näheren Charakterisierung dieses Gens wurde mit dem PCR01-Fragment als Sonde ein erneutes Genbank-Screening durchgeführt. So wurden elf mit der Sonde hybridisierende Phagenklone isoliert und bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Inserte dieser Phagen wurden durch Restriktions- und Southern-Analysen physikalisch kartiert. Der Klon λ -A11.1, der den zum PCR01-Fragment homologen DNA-Abschnitt in einem zentralen Bereich seines Insertes trug, wurde näher charakterisiert (vgl. Abbildung 5-19). Das Insert dieses Phagen wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Sal* I in den pBluescript II SK(-)-Plasmidvektor subkloniert. Die Inserte der resultierenden Plasmidsubklone wurden mit Standard-Primern (vgl. Kapitel 5.1) terminal ansequenziert und die ermittelten DNA-Sequenzen mit Hilfe des BLASTX-Programmes für Sequenzvergleiche mit der 'GenBank'-Datenbank eingesetzt [Gish & States, 1993]. Hierbei zeigte sich, daß das λ -A11.1-Insert fast über den gesamten Bereich von 15,8 kb Homologie zu PPS-Genen aufwies. Lediglich die letzten (3'-terminalen) ca. 200 bp zeigten keine Homologie zu PPS. Vielmehr konnte hier der Beginn eines neuen ORF identifiziert werden, der auf Sequenzebene Homologie zu Thioesterasen aufweist. Da derartige Thioesterasen häufig an terminalen Positionen von bakteriellen PPS-Operons lokalisiert sind, wurde davon ausgegangen, daß der hier beschriebene Sequenzbereich vermutlich das 3'-Ende des isolierten PPS-Systems repräsentiert [Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997].

Somit war es zur Charakterisierung des gesamten identifizierten PPS-Gens notwendig, weitere Phagenklone zu isolieren, die den klonierten Bereich des λ -A11.1-Insertes vorrangig in 5'-terminale Richtung erweiterten. Hierzu wurden nun in einer zweiten Runde des Genbank-Screenings ein terminales Restriktionsfragment des λ -A11.1-Insertes als Sonde eingesetzt (vgl. Abbildung 5-19). Mit diesem als Sonde C bezeichneten Fragment konnten 21 Phagenklone isoliert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Auch aus diesen Phagen wurde DNA isoliert und die Inserte physikalisch kartiert. Im folgenden wurde dann unter anderem der Phagenklon λ -C8.1 (ca. 14 kb Insert), der nur einen vergleichsweise geringen überlappenden Bereich mit λ -A11.1 aufwies (vgl. Abbildung 5-19), intensiv untersucht. Das Insert dieses Phagen wurde ebenfalls in der oben beschriebenen Art in Plasmidvektoren subkloniert und terminal ansequenziert. In Sequenzvergleichen wies der 5'-terminale Bereich

dieses Phageninsertes keinerlei Homologie zu PPS-Genen mehr auf, so daß von einer kompletten Klonierung des identifizierten PPS-Gens ausgegangen werden konnte.

Insgesamt umfassen die Inserte der isolierten Phagenklone λ -A11.1 und λ -C8.1 einen zusammenhängenden Bereich von ca. 26 kb des *B. licheniformis* Genoms, der größtenteils in Plasmidvektoren subkloniert wurde (vgl. Tabelle 5-5). Verbliebene Lücken zwischen den Plasmidsubklonen konnten durch PCR-Amplifikation der entsprechenden Bereiche aus chromosomaler oder Phagen-DNA geschlossen werden. Diese PCR-Fragmente und Plasmide dienten nun als Matrizen für DNA-Sequenzierungen. Hierbei wurde zur kompletten Bestimmung der DNA-Sequenz ebenfalls eine *primer-walking*-Strategie verwendet (vgl. Kapitel 5.3.1). Die analysierten DNA-Sequenzen wurden durch eine von Herrn Sascha Dökel durchgeführte Gegenstrangsequenzierung verifiziert. Somit wurden insgesamt 25941 bp analysiert, die in Analogie zu den *bac*-Genen einen typischen GC-Gehalt von 46 % aufweisen. Inzwischen wurden durch Herrn Dökel noch weitere, den hier beschriebenen Bereich 5' - und 3' - terminal erweiternde Regionen kloniert und sequenziert, in denen jedoch keine zusätzlichen PPS-Gene identifiziert werden konnten. Die hier beschriebene DNA-Sequenz ist in der ' Gen-Bank' -Datenbank unter U95370 gespeichert [Konz *et al.*, 1998].

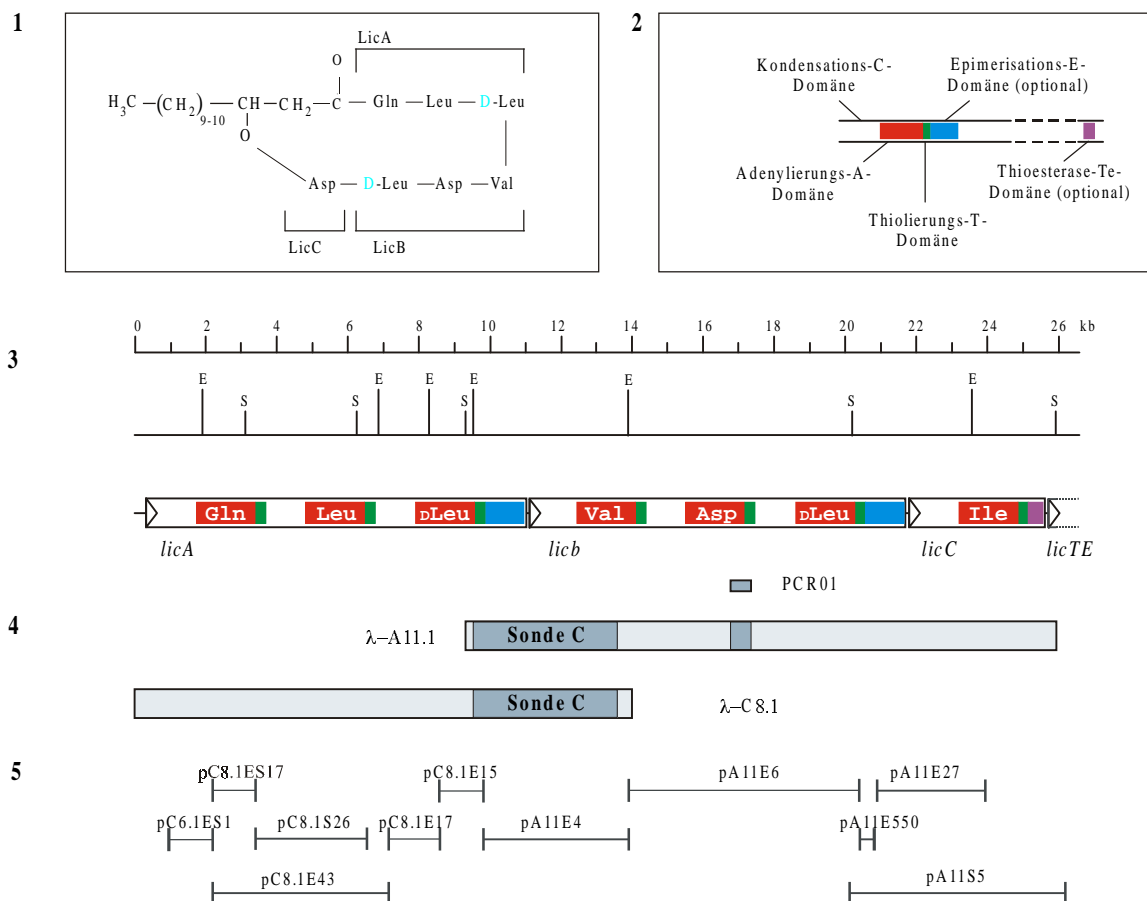


Abbildung 5-19 Ergebnisse der Klonierung und Sequenzierung des putativen Lichenysin Biosynthese-Operons. (1) Primärstruktur von Lichenysin D. Die Klammern geben an, welche Aminosäuren durch die putativen Lichenysin-Synthetasen LicA-C vermutlich in das Produktpeptid eingebaut werden. (2) Verwendeter Farbkod zur Veranschaulichung der Domänenstruktur des *lic*-Operons. (3) Physikalische Organisation des *lic*-Operons und seine durch Sequenzvergleiche identifizierte Domänenstruktur. (4) Relative Positionen der isolierten Phagenklone und des PCR01-Fragmentes, welches zum Screening der Genbank eingesetzt wurde. (5) Relative Positionen der erstellten Plasmidsubklone. Abkürzungen: E, EcoR I und S, Sal I.

Tabelle 5-5 Plasmidsubklone der Lambdaphagen λ -A11.1 und λ -C8.12

Plasmidklon	5' -Enzym (Position)	3' -Enzym (Position)	Größe
pC6.1ES1	<i>Sal I</i> (bp 962)	<i>EcoR I</i> (bp 1967)	1005 bp
pC8.1E43	<i>EcoR I</i> (bp 1967)	<i>EcoR I</i> (bp 6904)	4937 bp
pC8.1ES17	<i>EcoR I</i> (bp 1967)	<i>Sal I</i> (bp 3178)	1211 bp
pC8.1S26	<i>Sal I</i> (bp 3178)	<i>Sal I</i> (bp 6295)	3117 bp
pC8.1E17	<i>EcoR I</i> (bp 6904)	<i>EcoR I</i> (bp 8293)	1389 bp
pC8.1E15	<i>EcoR I</i> (bp 8293)	<i>EcoR I</i> (bp 9548)	1255 bp
pA11E4	<i>EcoR I</i> (bp 9548)	<i>EcoR I</i> (bp 13643)	4095 bp
pA11E6	<i>EcoR I</i> (bp 13643)	<i>EcoR I</i> (bp 20316)	6673 bp
pA11E550	<i>EcoR I</i> (bp 20316)	<i>EcoR I</i> (bp 20877)	561 bp
pA11E27	<i>EcoR I</i> (bp 20877)	<i>EcoR I</i> (bp 23579)	2702 bp
pBA11S5	<i>Sal I</i> (bp 20144)	<i>Sal I</i> (bp 25941)	4236 bp

5.4.2 Sequenzanalyse des *lic*-Operons

Mit Hilfe eingehender Sequenzuntersuchungen konnten im klonierten Bereich drei große ORFs (*licA-C*) mit derselben Transkriptionsrichtung identifiziert werden (vgl. Abbildung 5-19). Darüber hinaus schließt sich unmittelbar 3' -terminal von *licC* ein weiteres ORF (*licTE*) mit derselben Transkriptionsrichtung an, bei dem jedoch bereits nach den ersten 175 bp der klonierte Bereich abbricht. Das erste als *licA* bezeichnete ORF umfaßt 10.746 bp und kodiert somit für ein 3.582 Aminosäuren großes Protein mit einer berechneten Masse von 402.623 Da. Durch intensive Datenbankvergleiche mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, daß das kodierte Protein eine aus drei Modulen bestehende PPS darstellt. Die einzelnen Module setzen sich hierbei je aus einer C-, A- und T-Domäne zusammen. Das letzte Modul enthält zusätzlich eine E-Domäne und ist somit für den Einbau einer D-Aminosäure in das Produktpeptid verantwortlich. Das Auftreten einer N-terminalen C-Domäne bei dem ersten Modul repräsentiert eine Domänenorganisation, die typischerweise bei PPS-Systemen von Lipopeptiden wie z. B. Surfactin oder Fengycin gefunden wird [Cosmina *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Tognoni *et al.*, 1995]. Daher kann mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß das gebildete Produktpeptid ebenfalls an seiner ersten Aminosäure acyliert wird.

Das zweite, 10.764 bp umspannende ORF (*licB*) kodiert für ein 3.588 Aminosäuren (403.872 Da) großes Protein mit exakt derselben Domänenabfolge wie LicA. Mit 3.864 bp kodiert das dritte ORF (*licC*) für eine 1.288 Aminosäuren große PPS (144.919 Da) mit einem Modul, das eine C-terminale Te-Domäne enthält. Zusammengefaßt umspannen die drei Gene *licA-C* einen Bereich von 25.439 bp und kodieren für ein aus sieben Modulen bestehendes PPS-System. Aufgrund der geringen Abstände zwischen den Genen (*licA-licB*, 19 bp und *licB-C*, 38 bp) sowie dem Fehlen von detektierbaren Terminationssignalen, kann in Analogie zu

anderen bakteriellen PPS-Systemen auch hier eine Operon-ähnliche Organisation der Gene postuliert werden [Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997; Mootz & Marahiel, 1997a].

Durch die absolute Anzahl und die Abfolge der in diesem PPS-System identifizierten Module lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des zu erwartenden Produktpeptides ziehen. So kann korrespondierend zu den sieben charakterisierten Modulen die Bildung eines Heptapeptides erwartet werden, das an der dritten und sechsten Position eine D-Aminosäure trägt. Ferner deutet die oben beschriebene N-terminale C-Domäne des ersten Moduls auf eine Acylierung der ersten Aminosäure hin. Diese Befunde korrelieren perfekt mit den strukturellen Merkmalen der bisher aus *B. licheniformis* isolierten Lichenysin Lipopeptide oder dem von *B. subtilis* produziertem Surfactin. Tatsächlich besitzen die Surfactin Synthetasen SrfA A-C eine exakt identische Organisation wie LicA-C. Auch in Homologievergleichen einzelner Domänenfragmente zeigte sich stets mit den entsprechenden SrfA-Sequenzen der höchste Verwandtschaftsgrad von ca. 60 % Identität, gegenüber den für weitere PPS-Sequenzen ermittelten 35 bis 50 % Identität (z. B. Tyc und Grs). Noch höhere Homologiebeziehungen wurden allerdings zu einem erst kürzlich publizierten PPS-System (*lchA* A-C) des Lichenysin A Produzenten *B. licheniformis* BNP29 gefunden [Yakimov *et al.*, 1998]. Die Proteine der *lic*- und *lchA*-Systeme weisen durchschnittlich eine Identität von ca. 95 % auf und können somit als Stamm-spezifische Variationen derselben PPS betrachtet werden. Diese Daten belegen somit die Annahme, daß die in dieser Arbeit charakterisierten Gene *licA-C* ein Lichenysin Biosynthese-Operon darstellen.

Anhand der kürzlich gelösten Kristallstruktur der GrsA-A-Domäne konnte gezeigt werden, daß alle mit der Substrataminosäure spezifisch wechselwirkenden Reste des Proteins in einer sogenannten Bindungstasche lokalisiert sind [Conti *et al.*, 1997]. Bemerkenswerter Weise befinden sich alle Reste dieser Bindungstasche auf einem zusammenhängenden Sequenzabschnitt, der zwischen den Core-Motiven A3 und A6 lokalisiert ist (vgl. Kapitel 2.6.1). Ausgehend von dem hohen Konservierungsgrad dieses Domäentyps, kann somit gefolgert werden, daß auch in anderen A-Domänen der Substratspezifität determinierende Bereich in diesem Sequenzabschnitt lokalisiert ist. In detaillierten Sequenzvergleichen mit diesen ca. 180 Aminosäuren umfassenden Regionen von 61 A-Domänen aus *Bacillus* spp. konnte gezeigt werden, daß tatsächlich Domänen miteinander gruppieren, die gleiche oder ähnliche Aminosäuren erkennen und aktivieren. Die für die *lic*-Domänen erhaltenen Homologien bestätigen, daß dieses System ein Peptid der für Lichenysine charakteristischen Sequenz Glx-Leu-DLeu-Val-Asx-DLeu-Ile/Leu/Val generiert. Anhand dieser Daten war es allerdings nicht möglich die Spezifitäten der ersten, fünften und siebenten Position eindeutig zu determinieren. Daher wurden in weiterführenden Experimenten durch Herrn Sascha Dökel die A-Domänen der korrespondierenden *lic*-Module heterolog in *E. coli* expremiert, aufgereinigt und bezüglich ihrer Substratspezifität analysiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die Lic-Proteine ein Peptid mit der voraussichtlichen Sequenz Gln-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Ile produzieren, welches als Lichenysin D definiert wurde [Konz *et al.*, 1998].

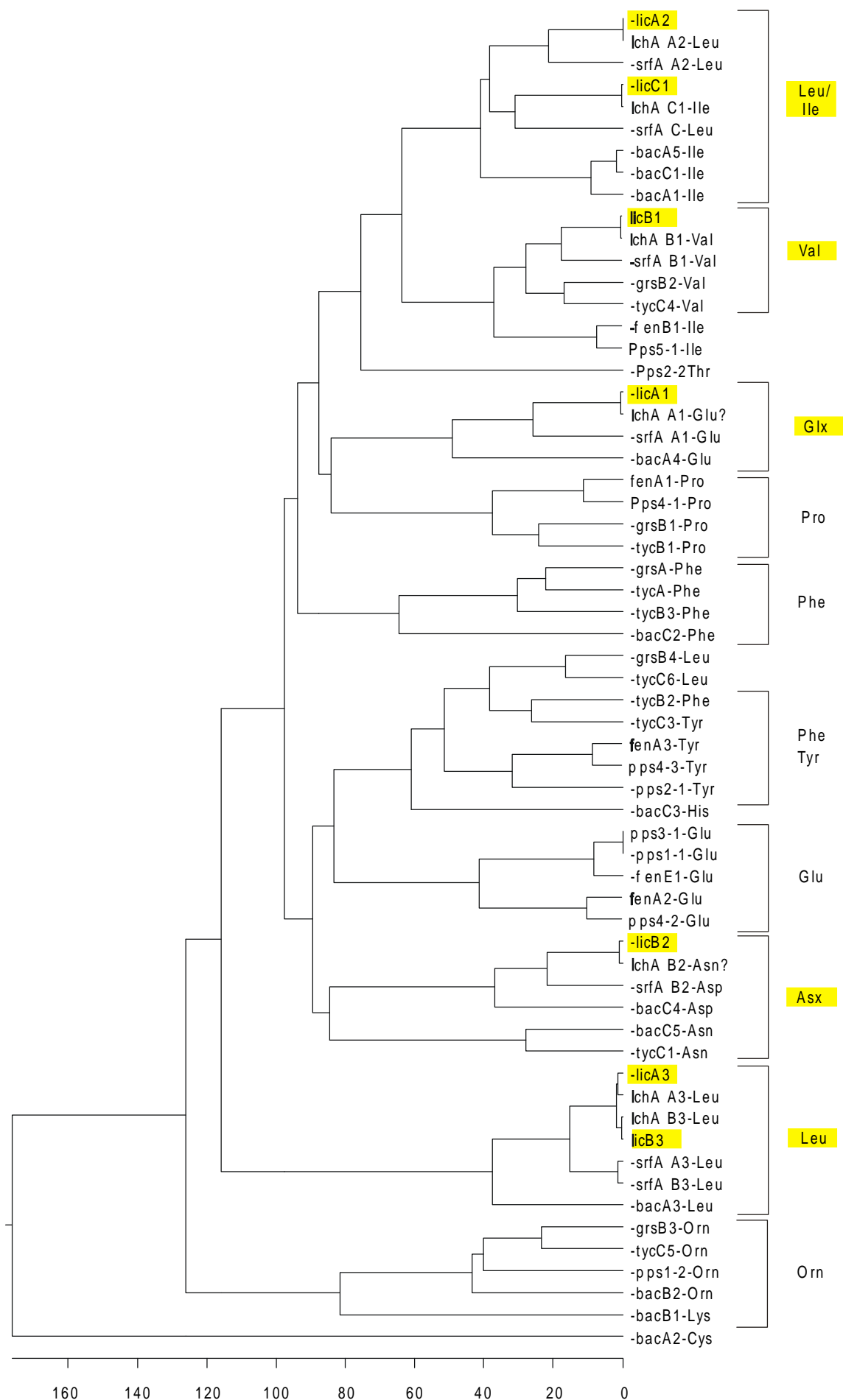


Abbildung 5-20 Phylogenetischer Stammbaum von A-Domänen aus *Bacillus* spp. Für den Sequenzvergleich mit dem clustalW-Programm wurde ein ca. 180 Aminosäuren langer Bereich eingesetzt, der zwischen den Core-Motiv A3 und A6 lokalisiert ist und mit der in GrsA identifizierten AS-Bindungstasche korreliert [Conti et al., 1997]. Für die Proteine wurden folgende Abkürzungen verwendet: bac, Bacitracin-Synthetasen [Konz et al., 1997]; fen, Fengycin-Synthetasen [Chen et al., 1995]; grs, Gramicidin S-Synthetasen [Krättschmar et al., 1989; Turgay et al., 1992]; lch, Lichenysin A-Synthetasen [Yakimov et al., 1998]; lic, Lichenysin-Synthetasen; pps, Plipastatin-Synthetasen [Tognoni et al., 1995] srfA, Surfactin-Synthetasen [Cosmina et al., 1993] und tyc, Tyrocidin-Synthetasen [Mootz & Marahiel, 1997b]. Die Beschriftungen für die einzelnen Domänen werden durch die Angabe von Untereinheiten (große Buchstaben), Modulposition (Ziffer) und Substratspezifität (3-Buchstabenkode) erweitert. Gruppierungen von Domänen gleicher oder ähnlicher Substratspezifität werden durch Klammern gekennzeichnet.

5.4.3 Analyse der Lichenysin-Produktion

Lichenysine besitzen in Analogie zu Surfactin eine hämolytische Aktivität. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um die bakterielle Produktion derartiger Lipopeptide zu kontrollieren. Hierzu werden die zu untersuchenden Bakterienstämme auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Wird von einer solchen Kolonie eine hämolytisch aktive Substanz produziert, so ist dies durch die Ausbildung klarer, farbloser Bereiche um die Bakterienkultur zu detektieren (vgl. Abbildung 5-23). In Experimenten mit *B. licheniformis* ATCC 10716 konnten jedoch keine derartigen Lysehöfe auf Blutagarplatten identifiziert werden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß dieser Stamm keine hämolytisch aktive Substanz und somit vermutlich auch kein Lichenysin produziert.

5.5 Bli – eine 4' -PAN-Transferase aus *B. licheniformis*

Von Gaidenko et al. wurde ein als *bli* bezeichnetes Gen beschrieben, das die Bacitracin Biosynthese in *B. licheniformis* (Stamm 1001) reguliert [Gaidenko & Khaikinson, 1988]. Durch Sequenzvergleiche zeigten die Autoren, daß das *bli*-Genprodukt Homologie zu den Proteinen Gsp aus *B. brevis* und Sfp aus *B. subtilis* aufweist. Wie wir heute wissen handelt es sich bei diesen Enzymen um 4' -PAN-Transferasen, die für die posttranslationale Modifikation von PPS mit ihren 4' -PAN-Kofaktoren verantwortlich sind [Lambalot et al., 1996]. Somit kann davon ausgegangen werden, daß das *bli*-Gen für eine 4' -PAN-Transferase kodiert, die mit dem Bacitracin Biosynthesystem assoziiert ist. Freundlicherweise wurde von Frau Tanya Gaidenko das Plasmid pBA23 zu Verfügung gestellt, welches auf einem 1,6 kb großen *Pst* I/*Eco* RI-Insert das intakte *bli*-Gen trägt [Gaidenko & Khaikinson, 1988]. Dieses Plasmid besitzt ferner einen Replikationsursprung für *E. coli* und *Bacillus* und kann somit als shuttle-Vektor eingesetzt werden, wobei in *E. coli* auf Ampicillin- und in *Bacillus* auf Erythromycin-Resistenz selektioniert werden kann.

5.5.1 Amplifikation und Klonierung des *bli*-Gens aus *B. licheniformis* ATCC 10716

Durch Southern-Analysen mit chromosomaler DNA konnte unter Verwendung des BA23-Insertes gezeigt werden, daß auch der in dieser Arbeit untersuchte Bacitracin Produzent ein *bli* homologes Gen trägt. Somit wurden zur PCR-Amplifikation dieses Genes synthetische Oligonukleotide erzeugt, die aus der *bli*-Sequenz abgeleitet wurden (vgl. Anhang 7.3). Ähnlich wie in Kapitel 5.3.4.1 beschrieben wurden auch diese Primer mit 5' -Modifikationen versehen, so daß in die zu amplifizierenden DNA-Fragmente spezifisch terminale Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Sph* I und *Bam* HI eingefügt wurden. Durch

die geeignete Positionierung der Primer wurde das *bli*-ATG-Startkodon in die *Sph* I-Sequenz eingearbeitet und das Stopkodon durch Einfügen der *Bam* HI Sequenz deletiert. Nachfolgend sind die Sequenzen der verwendeten Primer dargestellt. Die 5' -Modifikationen werden durch kursive und die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen durch fette Buchstaben gekennzeichnet:

5' -*bli**Sph* I) : 5' ATA **GCA TGC** AGA TTT ACG GCG TTA TAT GG-3'

3' -*bli**Bam* HI): 5' ATA **GGA ATC** CAA GCG TTG ACA TTC AGC G-3'

Die nach PCR erhaltenen ca. 700 bp großen DNA-Fragmente wurden mit dem PCR Purification Kit (*QIAGEN*) aufgereinigt und nachfolgend mit den Restriktionsendonukleasen *Sph* I und *Bam* HI hydrolytisch gespalten. Die resultierenden Fragmente konnten dann für eine gerichtete Ligation mit dem ebenfalls *Sph* I/*Bam* HI geschnittenem pQE70-Vektor eingesetzt werden. Hierdurch wurde das *bli*-Gen um sechs His-Kodone des Vektors erweitert. Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit dem Ligationsansatz wurden aus üN-Kulturen von je sechs Transformanten Plasmide isoliert. Ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Sph* I und *Bam* HI zeigte, daß alle Plasmide die erwarteten Inserte enthielten. Für weitere Untersuchungen wurde das Plasmid pQE-Bli ausgewählt. Die Fusionsstellen zwischen dem Vektor und den klonierten *bli*-Fragment konnte durch Sequenzierung mit den pQE-Primern 5' -Promotor und 3' -Terminator verifiziert werden. Durch diese Sequenzierungen konnte für das Plasmid pQE-Bli gezeigt werden, daß sowohl das ATG-Startkodon als auch die sechs His-Kodone sich im selben Leseraster mit dem klonierten *bli*-Fragment befinden. Das hier aus *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifizierte Gene weist auf DNA-Ebene 99 % Identität mit dem *bli*-Gen aus *B. licheniformis* (Stamm 1001) auf [Gaidenko & Khaikinson, 1988].

Alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden mit dem aus *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifizierten *bli*-Gen durchgeführt.

5.5.2 Expression und Reinigung von Bli

Zur Überproduktion des Bli-Proteins wurden kompetente *E. coli* M15 [pREP4] Zellen mit dem Plasmid pQE-Bli transformiert. Diese Zellen wurden in Analogie zu dem in Kapitel 5.3.4.2 beschriebenen Verfahren für eine präparative Expression des *bli*-Gens eingesetzt. Durch SDS-PAGE konnte nach Induktion mit IPTG die Bildung einer neuen Proteinbande nachgewiesen werden, deren elektrophoretische Beweglichkeit mit der berechneten Masse von Bli (26.594 Da) korreliert (vgl. Abbildung 5-21 Spur 1-4). Die nach Induktion präzipitierten Zellen wurden in Puffer A resuspendiert und über eine French Press (*SLM Aminco*) aufgeschlossen. Der Überstand des Proteinextraktes wurde mit 10 % Puffer B versetzt und auf die Ni²⁺-NTA-Säule einer FPLC-Anlage bei einer Flußrate von 1,0 mL·min⁻¹ aufgetragen. Das in Puffer B enthaltene Imidazol bindet an das Säulenmaterial und verdrängt die unspezifisch daran gebundenen Proteine. Die Elution des Bli-Proteins erfolgte durch das Anlegen eines Gradienten, dessen Anteil an Puffer B innerhalb von 45 min von 10 % auf 100 % anstieg. Der Anstieg der Absorption zeigte die Elution eines Proteins bei ca. 60 % Puffer B an.

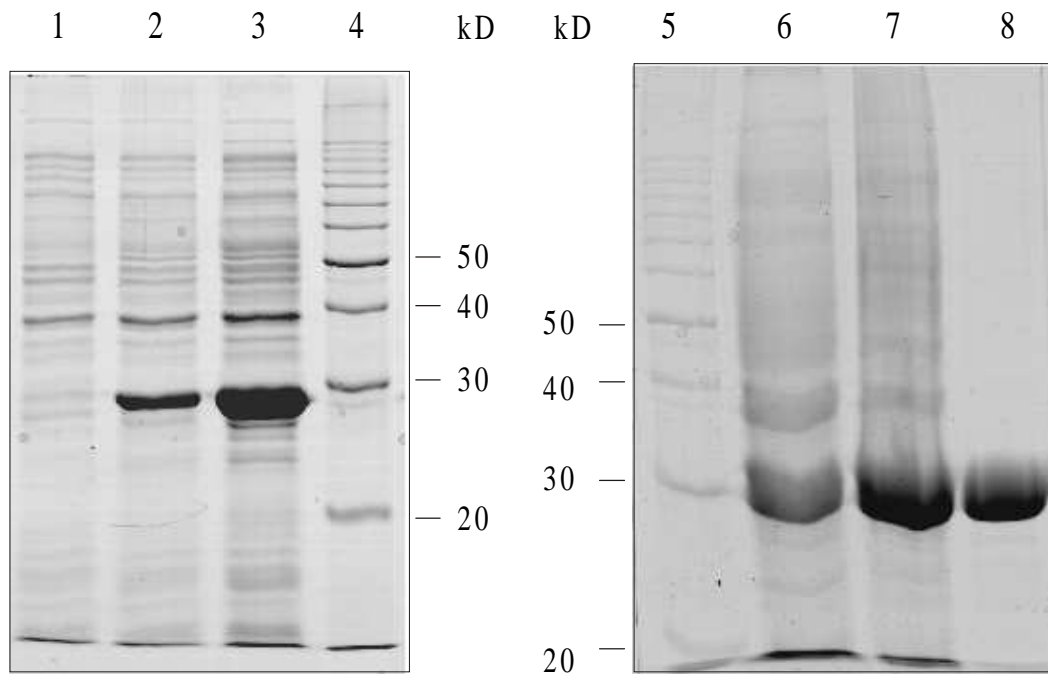


Abbildung 5-21 Coomassie Blue gefärbtes SDS-PAGE mit Proben der Bli-Expression und -Aufreinigung. In den einzelnen Spuren sind aufgetragen: 1. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T₀ (unmittelbar vor IPTG-Zugabe), 2. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T₁ (1 h nach IPTG-Zugabe), 3. Gesamtzellextrakt der Expressionskultur zum Zeitpunkt T₂ (2 h nach IPTG-Zugabe), 4./5. Größenstandard, 6. Pellet nach Zellaufschluß, 7. Überstand nach Zellaufschluß und 8. durch Imidazol von der Ni²⁺-NTA-Säule eluiertes Bli.

Durch SDS-PAGE wurde gezeigt, daß die Fraktionen mit erhöhter Absorption gereinigtes Bli enthielten. In Abbildung 5-21 sind die Expression und Aufreinigung von Bli dargestellt. Sowohl im Gesamtzellextrakt nach Induktion (Spur 3) als auch im Überstand nach Zellaufschluß (Spur 7), waren die Banden des Bli-Proteins zu erkennen. Aber auch im Pellet nach Zellaufschluß konnte ein relevanter Anteil des expremierten Bli detektiert werden (Spur 6), wodurch angezeigt wurde, daß dieses Protein nur zu ca. 75 % in löslicher Form expremiert wird. Durch die Bindung an die Ni²⁺-NTA-Säule konnte Bli bis zur Homogenität aufgereinigt werden (Spur 8). Derartig aufgereinigte Bli-Fractionen wiesen jedoch eine deutliche Präzipitationsneigung auf. Dieser Effekt konnte jedoch in Folgeexperimenten weitgehend durch die Verwendung eines leicht modifizierten FPLC-Puffersystems (Puffer A^{*}/B^{*}) zurückgedrängt werden.

Puffer A[*]	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	NaCl	500	mM
	β-ME	10	mM
Puffer B[*]	Natriumphosphat pH 8,0	50	mM
	NaCl	500	mM
	β-ME	10	mM
	Imidazol	250	mM

Für die weitere biochemische Charakterisierung des Bli-Proteins mußte das im Elutionspuffer enthaltenen Imidazol durch Dialyse gegen Puffer A^{*} entfernt werden.

5.5.3 Modifikation von BacA-Modulproteinen durch Bli

Die BacA-Modulproteine BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 wurden in Analogie zu dem in Kapitel 5.3.4.5 beschriebenen Verfahren durch Bli mit 4' -PAN modifiziert und anschließend mit den radioaktiv markierten Substrataminosäuren [^{14}C]-Ile und [^{35}S]-Cys beladen. Im Gegensatz zu den Modifikationsreaktionen mit Sfp trat jedoch bei der Präinkubation mit Bli und CoA stets eine Trübung des Reaktionsansatzes auf, die vermutlich auf die Präzipitation von Bli zurückzuführen ist (s. o.).

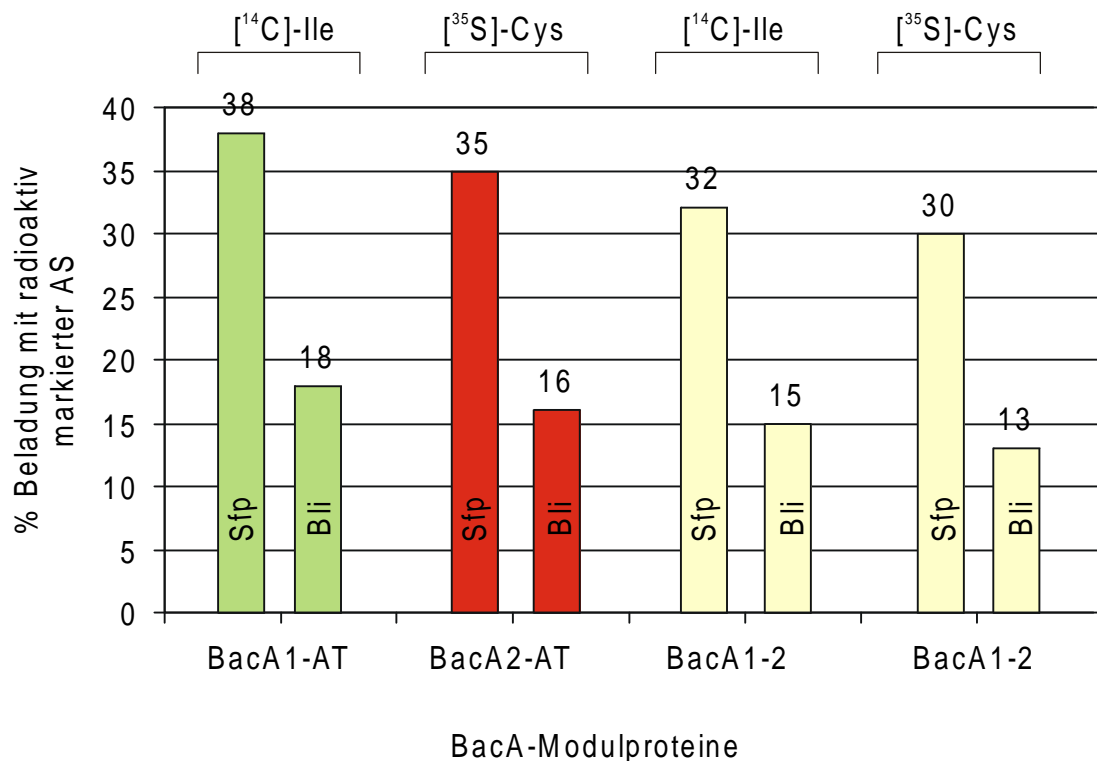


Abbildung 5-22 Beladung der BacA-Modulproteine BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 mit ihren radioaktiv markierten Substrataminosäuren [^{14}C]-Ile und [^{35}S]-Cys nach einer Modifikation mit 4' -PAN durch die Enzyme Sfp und Bli.

Nach der Modifikation der BacA-Modulproteine durch Bli wurden diese zu ca. 13 bis 18 % mit ihren radioaktiv markierten Substrataminosäuren beladen. Dies entspricht in etwa der Hälfte der Beladungswerte, die nach einer Modifikation mit Sfp erhalten wurden. Da aber in Kontrollexperimenten ohne Zugabe einer 4' -PAN-Transferase die Beladungswerte der BacA-Modulproteine kleiner als 1 % waren, belegen die in Abbildung 5-22 dargestellten Ergebnisse die funktionelle Aktivität des aufgereinigten Bli-Proteins. Die im Vergleich zu Sfp erniedrigte Aktivität ist hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit auf die reduzierte Löslichkeit des rekombinanten Bli-Proteins zurückzuführen.

5.5.4 In vivo Komplementation von *sfp* durch *bli* in *B. subtilis* JH642

Von Nakano et al. wurde gezeigt, daß das *sfp*-Gen für die Produktion des Peptid-Antibiotikums Surfactin essentiell ist [Nakano et al., 1988]. Der Surfactin-negative Phänotyp des Stammes *B. subtilis* JH642 ist allein auf ein mutiertes *sfp*-Gen (*sfp*⁰) zurückzuführen. Durch eine Baseninsertion und den Austausch von fünf Basen in *sfp* wird in JH642 ein verkürztes nicht funktionelles Sfp-Protein synthetisiert. Um zu untersuchen, ob das Bli-Protein

die Funktion von Sfp in *B. subtilis* wahrnehmen kann, sollte der Versuch unternommen werden, den Defekt im *sfp*-Gen *in trans* durch *bli* zu komplementieren. Dafür wurde das *shuttle*-Plasmid pBA23 [Gaidenko & Khaikinson, 1988], welches das funktionelle *bli*-Gen aus dem Stamm *B. licheniformis* 1001 enthält, in *B. subtilis* JH642 transformiert. Aus üN-Kulturen von vier der erhaltenen Transformanten wurden Plasmide isoliert. Durch eine Restriktions- und Southern-Analyse konnte gezeigt werden, daß es sich bei den isolierten Plasmiden um pBA23 handelte. Für weitere Untersuchungen wurde eine dieser Kolonien ausgewählt, die im weiteren Verlauf als DK1 bezeichnet wird.

Die hämolytische Wirkung von Surfactin wurde ausgenutzt, um eine mögliche Komplementation von *sfp*⁰ in *B. subtilis* JH642 durch *bli* nachzuweisen. Auf einer Blutagarplatte wurden Zellen des Surfactin-Produzenten *B. subtilis* ATCC 21332, des Nichtproduzenten JH642 (*sfp*⁰) und des rekombinanten JH642-Derivates DK1 (*sfp*⁰ *bli*) ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte üN bei 37°C waren in Bereichen um die Zellen von ATCC 21332 und DK1 helle, durchsichtige Bereiche zu sehen, die sich deutlich von der sonst roten und trüben Agarplatte abhoben. Die Aufhellungen waren durch das von beiden Stämmen produzierte Surfactin entstanden, das die Erythrozyten in der Blutagarplatte lysierte. Im Gegensatz dazu wurde von den JH642 Zellen keine hämolytisch aktive Substanz produziert. Somit war offensichtlich, daß das *bli*-Gen die Funktion des *sfp*-Gens in *B. subtilis* übernehmen konnte und die Produktion von Surfactin induzierte.

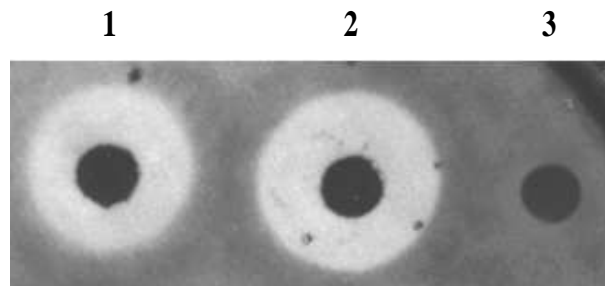


Abbildung 5-23 Nachweis von Surfactin-Produktion auf einer Blutagarplatte. Gezeigt ist eine üN bei 37°C inkubierte Blutagarplatte, auf der Zellen der folgenden *B. subtilis* Stämme ausgestrichen wurden: 1) DK1, 2) ATCC 21332 und 3) JH642.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons

Das von einigen *Bacillus licheniformis* Stämmen produzierte Peptid Bacitracin gehörte zu den ersten überhaupt identifizierten Peptid-Antibiotika [Johnson *et al.*, 1945]. Infolgedessen war die Aufklärung seiner Biosynthese Gegenstand langjähriger, intensiver Untersuchungen. Als Ergebnis dieser Forschungen konnte gezeigt werden, daß die Bacitracin Biosynthese nicht-ribosomal an einem multifunktionellen Enzymkomplex erfolgt, der sich aus den drei Bacitracin-Synthetasen BA1-3 zusammensetzt. Diese Enzyme wurden bereits Anfang der 70er Jahre isoliert und in der Folgezeit eingehend biochemisch sowie enzymologisch untersucht [Ishihara *et al.*, 1968; Frøyskov, 1974]. Die Bacitracin-Synthetase BA1 ist verantwortlich für die Aktivierung und Verknüpfung der N-terminalen fünf Aminosäuren von Bacitracin [Frøyskov, 1984]. Weiterhin induziert dieses Enzym auf der Stufe des Dipeptides die Bildung des ungewöhnlichen Thiazolinringes zwischen den ersten beiden Aminosäuren Ile¹ und Cys² [Ishihara & Shimura, 1979; Ishihara & Shimura, 1988]. BA2 erweitert das von BA1 generierte Pentapeptid um zwei Aminosäuren und reicht das resultierende Heptapeptid an BA3 weiter. Diese Synthetase baut dann die C-terminalen fünf Aminosäuren in das Produktpeptid ein und setzt schließlich das verzweigt-zyklische Bacitracin frei [Frøyskov, 1984].

Im Gegensatz zu den umfassenden biochemischen Kenntnissen des Bacitracin Biosynthese-Apparates war bis zu Beginn dieser Arbeit nur wenig auf molekulargenetischer Ebene dieses Systems bekannt. So waren zwar bereits eine genetische Kartierung [Podlesek & Grabnar, 1987] und teilweise Klonierung [Ishihara *et al.*, 1989] der Bacitracin-Synthetasegene durchgeführt worden, aber Sequenzdaten hierüber waren nicht verfügbar. Dies ist aber gerade im Fall des Bacitracin-Systems von Interesse, da es mit seinen zwölf Aminosäuren ein großes Informationspotential für die allgemeine Aufklärung der Domänenstruktur von PPS in sich birgt. Insbesondere gilt dies auch für die Domänen, die an der Aktivierung und Prozessierung der Aminosäuren des ungewöhnlichen Thiazolinringes beteiligt sind. Aber auch in Hinblick auf die Bereitstellung eines möglichst großen Pools an verschiedenen Domänen, die über molekulargenetische Rekombinationstechniken ausgetauscht werden können, ist die genaue Charakterisierung von PPS-Genen von Bedeutung. Dies gilt um so mehr für das Bacitracin-System, als daß es Aminosäuren funktionalisiert, die von anderen PPS-Systemen nicht oder nur selten in die gebildeten Produkte eingebaut werden, wie z. B. Cys, Lys oder His (vgl. Anhang 7.1).

6.1.1 Identifizierung des *bac*-Operons

In dieser Arbeit wurde mit einer von K. Turgay entwickelten PCR-Methode das Bacitracin Biosynthese-Operon aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 identifiziert [Turgay & Marahiel, 1994]. Hierbei wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer verwendet, die sich von den hochkonservierten Core-Motiven A7 und T bekannter PPS ableiteten (vgl. Abbildung 2-5). Während die Core-Motive A2 bis A10 auch in anderen Adenylat-bildenden Enzymen,

wie z. B. Acetyl-CoA-Synthetasen [Turgay *et al.*, 1992] oder Luciferasen [Conti *et al.*, 1996] vorkommen, ist das Core-Motiv T spezifisch für die T-Domänen aus PPS. Durch Verwendung eines Primers, der sich von dieser Sequenz ableitet, wurde somit die Amplifikation von Genen anderer Adenylat-bildender Enzyme vermieden. Es wurde ein ca. 500 bp großes Fragment aus chromosomaler DNA von *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert, das die internen Core-Motive A8-A10 in den zu erwartenden Lokalisationen enthielt.

Dieses PCR-Fragmente wurde als Sonde für das Screening einer in dieser Arbeit konstruierten Lambda EMBL III Genbank chromosomaler DNA aus *Bacillus licheniformis* eingesetzt. Es konnten mehrere rekombinante Phagenklone isoliert werden, die auf einem zusammenhängenden DNA-Bereich von ca. 46 kb das gesamte Bacitracin Biosynthese-Operon trugen. Dieser komplette Bereich wurde in Plasmidvektoren subkloniert und die DNA-Sequenz ermittelt. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß sich das *bac*-Operon aus den drei Genen *bacA-C* zusammensetzt, die für die drei Bacitracin-Synthetasen BA1-3 kodieren. Anhand der bestimmten DNA-Sequenzen war es nun erstmals möglich die Molekulargewichte dieser Enzyme exakt zu berechnen. Hierbei zeigte sich, daß die ursprünglich, experimentell abgeschätzten Größen [Frøyshov, 1984] deutlich kleiner als die berechneten Molmassen waren. Ähnliche Beobachtungen wurden jedoch auch für die Synthetasen der Grs-, SrfA- und Tyc-Systeme berichtet, wodurch die Schwierigkeit dokumentiert wird, Molekulargewichte derartig großer Proteine experimentell zu ermitteln [Turgay *et al.*, 1992; Cosmina *et al.*, 1993; Mootz & Marahiel, 1997b].

Tabelle 6-1 Molekulargewichte der Bacitracin-Synthetasen

Protein	Molekulargewicht	Molekulargewicht
	(experimentell)	(berechnet)
BA1	335 kDa	598 kDa
BA2	240 kDa	297 kDa
BA3	380 kDa	723 kDa

6.1.2 Domänenorganisation des *bac*-Operons

In der nicht-ribosomalen Peptidsynthese dienen die PPS als Proteinmatrize für die zu synthetisierenden Peptide. Somit determiniert die Domänenabfolge der PPS die Sequenz und Struktur der gebildeten Produkte. Auch die aus den Genen *bacA-C* abgeleitete Domänenstruktur der kodierten Proteine spiegelt in perfekter Kolinearität die strukturellen Eigenschaften des gebildeten Produktpeptides und die biochemischen Merkmale der Bacitracin-Synthetasen wider. Besonders interessant war hierbei die Identifizierung von insgesamt drei internen E-Domänen (BacA4, BacC2 und BacC4), da in allen bis zu diesem Zeitpunkt analysierten PPS-Systemen derartige Domänen ausschließlich an C-terminalen Positionen gefunden wurden. Die einzige Ausnahme bildete die aus dem filamentösen Pilz *Cochliobolus carbonum* stammende HC-Toxin Synthetase Hts1, die verknüpft mit ihrem ersten Modul ebenfalls eine interne E-Domäne enthält. Daher wurde für bakterielle Systeme eine funktionelle Bedeutung dieser einheitlichen Lokalisation der E-Domänen für möglich gehalten [Stachelhaus & Marahiel, 1995a]. Die hier identifizierten internen E-Domänen belegen dagegen, daß dieser Domärentyp nicht an eine spezifisch terminale Positionierung innerhalb

der PPS gekoppelt ist und unterstreichen somit einmal mehr die funktionelle Eigenständigkeit von PPS-Domänen. Inzwischen wurden weitere Beispiele von internen E-Domänen aus bakteriellen und pilzlichen Systemen beschrieben, die diesen Befund nachhaltig unterstützen [Bailey *et al.*, 1996; McHenney *et al.*, 1998; van Wageningen *et al.*, 1998].

Das auffälligste strukturelle Merkmal von Bacitracin stellt der Thiazolinring zwischen den ersten beiden Aminosäuren Ile¹ und Cys² dar. In der Domänenabfolge des von *bacA* kodierten BA1-Proteins wurde dementsprechend zwischen den ersten beiden Modulen ein neuer Domärentyp identifiziert. In Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, daß derartige Domänen ebenfalls in weiteren PPS-Systemen auftreten, die an der Produktion von Catechol-Siderophoren mit Thiazolin- oder Oxazolinringen beteiligt sind (vgl. Kapitel 5.3.3). Anhand dieser Daten konnte erstmals eine funktionelle Bedeutung dieses Domärentyps mit einer Heterozyklenbildung in der nicht-ribosomalen Peptidsynthese gezeigt werden [Konz *et al.*, 1997]. Daher wurden diese Domänen als putative Zyklisierungs-Z-Domänen charakterisiert. Diese Hypothese wird stark durch neuere Untersuchungen am Yersiniabactin-Biosynthesystem unterstützt [Gehring *et al.*, 1998]. Yersiniabactin ist ein Catechol-Siderophor, das unter Eisenmangelbedingungen von einigen pathogenen *Yersinia* Spezies produziert wird (vgl. Abbildung 5-3) [Chambers *et al.*, 1996]. Seine Biosynthese erfolgt ebenfalls nicht-ribosomal an einem multifunktionellen Enzymkomplex, der sich voraussichtlich aus den drei Enzymen YbtE, HMWP1 und HMWP2 zusammensetzt [Guilvout *et al.*, 1993; Heesemann *et al.*, 1993; Bearden *et al.*, 1997]. Es konnte gezeigt werden, daß die Yersiniabactin-Synthese durch YbtE initiiert wird, welches Salicylat als Adenylat aktiviert und nachfolgend auf einen 4'-PAN-Kofaktor von HMWP2 überträgt. Dieses Enzym baut dann vermutlich zwei Cys-Reste in das Produkt ein und prozessiert diese zu einem Thiazolin- (Cys¹) bzw. Thiazolidinring (Cys²). Von HMWP1 wird angenommen, daß es dann den C-terminalen, Polyketidhaltigen Anteil von Yersiniabactin funktionalisiert und das fertige Produkt freisetzt. Mit einem Enzymsystem, das sich aus rekombinantem YbtE und einem HMWP2-Fragment (AS 1-1491, vgl. Abbildung 6-1) zusammensetzt, ist es nun gelungen in Gegenwart der Substrate ATP, Salicylat und Cys die Bildung von Hydroxyphenylthiazolin (HPT) bzw. Hydroxyphenylthiazolin-cystein (HPT-Cys) nachzuweisen [Gehring *et al.*, 1998]. Die Bildung von HPT-Cys wird hierbei auf eine unkatalysierte Reaktion des als Thioester mit dem HMWP2-Fragment verknüpften HPT mit freiem Cys zurückgeführt. Diese Daten belegen somit die postulierte funktionelle Aktivität der im HMWP2-Fragment enthaltenen Z-Domäne, die hohe Homologie zur BA1-Z-Domäne aufweist (vgl. Tabelle 5-2).

Anhand der Sequenzhomologie von Z-Domänen zu klassischen C-Domänen von PPS, kann geschlossen werden, daß beide Domärentypen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen. Diese Interpretation wird durch die Äquivalenz der katalysierten Reaktionen unterstrichen. So katalysieren sowohl die C-Domäne als auch die Z-Domäne eine Kondensation zweier Aminosäuren unter Ausbildung einer Peptidbindung, bei welcher nachfolgend durch die Z-Domäne eine Heterozyklenbildung induziert wird. Aus diesem Grund ist das Auftreten von hochkonservierten Resten, die in beiden Domärentypen auftreten von besonderem Interesse (vgl. Kapitel 5.3.3). Möglicherweise spielen diese Reste eine essentielle Rolle in der Katalyse der Elongationsreaktion. Diesbezüglich ist jedoch die fehlende Konservierung des zweiten Histidin des C3-Motivs in Z-Domänen erstaunlich, da für diesen Rest eine wichtige Rolle in der Kondensationsreaktion nachgewiesen werden konnte [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Dennoch könnten vergleichende Analysen beider Domärentypen, wie z. B. durch ortsge-

richtete Mutageneseverfahren, tiefgreifende Einblicke in die Mechanismen der Kondensations- und Zyklisierungsreaktion ermöglichen.

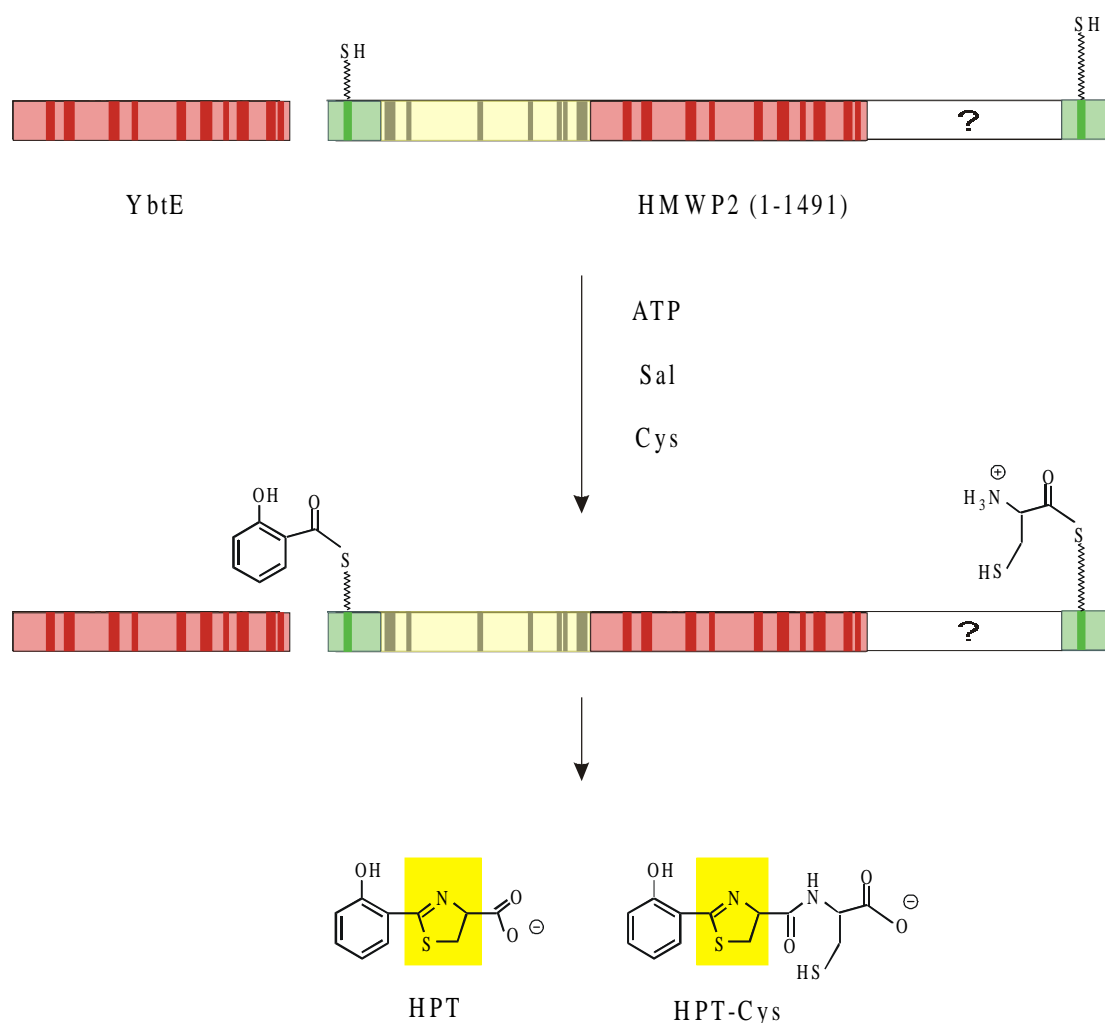


Abbildung 6-1 Thiazolinringbildung durch HMWP2 aus *Yersinia pestis*. Durch Inkubation der Aryl-AMP-Ligase YbtE und eines HMWP2-Fragmentes (AS 1-1491) mit ihren Substraten ATP, Sal und Cys konnte die Bildung eines thiazolinhaltigen Produktes nachgewiesen werden [Gehring *et al.*, 1998]. Abkürzungen: Sal, Salicylat; HPT, Hydroxyphenylthiazolin und HPT-Cys, Hydroxyphenylthiazolin-cystein.

Die wichtigste biologische Funktion von Bacitracin besteht in einer Inhibierung der Zellwandbiosynthese in Gram-positiven Organismen. Diese Wirkung wird auf die Ausbildung eines festen ternären Komplexes zwischen IPP, einem divalenten Metallkation und Bacitracin zurückgeführt (vgl. Abbildung 2-9) [Stone & Strominger, 1971; Storm & Strominger, 1973]. Aus diesem Grund wurden die Metallionen-Bindungseigenschaften von Bacitracin intensiv untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß der Thiazolinring eine essentielle Rolle in der Koordination der gebundenen Ionen spielt [Scogin *et al.*, 1980]. Ähnliche Verhältnisse werden auch in zahlreichen Eisen komplexierenden Siderophoren gefunden, die derartige Thiazolin- und Oxazolinstrukturmerkmale enthalten (vgl. Tabelle 6-2). Diese Verbindungen werden von Mikroorganismen in das sie umgebende Medium ausgeschieden, um freie Eisenionen zu binden und in die Zelle zu transportieren [von Döhren & Kleinkauf, 1997]. Da in Körperflüssigkeiten die Konzentrationen an freien Eisenionen extrem niedrig sind (10^{-8} M), haben insbesondere pathogene Mikroorganismen häufig sehr effiziente Siderophore ent-

wickelt. Mehrfach konnte schon gezeigt werden, daß die Virulenz derartiger Bakterien eng mit der Fähigkeit der Siderophoren-Produktion verknüpft ist [Heesemann, 1987; Actis *et al.*, 1988]. Insofern ist die mechanistische Aufklärung der Heterozyklenbildung derartiger Verbindungen von herausragendem Interesse, da die an der Siderophoren-Produktion beteiligten Enzyme möglicherweise neue, aussichtsreiche Angriffsorte für zukünftige Antibiotika darstellen könnten.

Tabelle 6-2 Siderophore mit Thiazolin- und Oxazolinringen

Siderophor	Organismus	Thiazolin (T)	pathog.	Literatur
		Oxazolin (O)		
Acinetobactin	<i>Acinetobacter baumannii</i>	O	+	[Yamamoto <i>et al.</i> , 1994]
Agrobactin	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	O		[Ong <i>et al.</i> , 1979]
Anguibactin	<i>Vibrio anguillarum</i>	T	+	[Jalal <i>et al.</i> , 1989]
Desferrithiocin	<i>Streptomyces antibioticus</i>	T		[Naegeli <i>et al.</i> , 1980]
Fluvibactin	<i>Vibrio fluvialis</i>	O	+	[Yamamoto <i>et al.</i> , 1993]
Frankobactin	<i>Frankia</i>	O		[Aronson <i>et al.</i> , 1994]
Mycobactin	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	O	+	[Snow, 1970; Ratledge <i>et al.</i> , 1996]
Parabactin	<i>Paracoccus denitrificans</i>	O		[Peterson <i>et al.</i> , 1979]
Pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	T	+	[Cox, 1981]
Vibriobactin	<i>Vibrio cholerae</i>	O	+	[Griffith <i>et al.</i> , 1984]
Vulnibactin	<i>Vibrio vulnificus</i>	O	+	[Okujo <i>et al.</i> , 1994]
Yersiniabactin	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pestis</i>	T	+	[Haag <i>et al.</i> , 1993; Chambers <i>et al.</i> , 1996]

Heterozyklische Ringstrukturen der Thiazol-/Oxazol-Gruppe werden neben den Siderophoren und Bacitracin auch in einer Reihe weiterer natürlicher Verbindungen gefunden, die zum Teil recht bemerkenswerte therapeutische Eigenschaften aufweisen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderen die Antitumorstoffe Bleomycin [Dorr, 1992] und Epothilon [Bollag *et al.*, 1995], die Inhibitoren der Proteinbiosynthese Thiostrepton [von Döhren & Kleinkauf, 1997] und GE2270A [Selva *et al.*, 1997] sowie der DNA-Gyraseinhibitor Microcin B17 [Yorgey *et al.*, 1993]. Für das ribosomal von *E. coli* synthetisierte Microcin B17 wurde vor kurzem ein Modifikationssystem beschrieben, das die Thiazol-/Oxazolbildung vermittelt [Li *et al.*, 1996]. Hierbei werden 14 der 43 Aminosäuren von Prä-Microcin B17 unter ATP-Verbrauch in vier Thiazol- und vier Oxazolringe transformiert. Diese posttranslationale Prozessierung wird durch einen aus den drei Enzymen MccB-D bestehenden Enzymkomplex vermittelt.

Sequenzvergleiche mit diesen Proteinen zeigten jedoch keine Homologie zu den Z-Domänen von PPS. Somit kann davon ausgegangen werden, daß beide Systeme zwar ähnliche Reaktionen katalysieren, sich aber unabhängig voneinander entwickelt haben.

6.2 Biochemische Charakterisierung von BacA-Modulproteinen

Zur Verifizierung der postulierten Domänenstruktur des, in dieser Arbeit identifizierten, bac-Operons wurden die ersten beiden in die Thiazolinringbildung involvierten Module von BA1 biochemisch charakterisiert. Hierzu wurden *bacA*-Genfragmente der ersten beiden AT-Minimalmodule und ein beide Module umfassendes Fragment über PCR amplifiziert, kloniert und als His₆-tag-Fusionen in *E. coli* expremiert. Die affinitätschromatographische Auftrennung lieferte ausreichende Menge der bis zur Homogenität gereinigten Proteine BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2. Diese wurden auf ihre Aminosäure-abhängige ATP-PP_i-Austauschaktivität und -spezifität, ihre Affinität zu ATP und den Substrataminosäuren sowie ihre Fähigkeit zur kovalenten Bindung der kognaten Aminosäuren untersucht. Ferner wurden die Produktbildungseigenschaften von BacA1-2 näher charakterisiert.

6.2.1 Adenylierung

In Aminosäure-abhängigen ATP-PP_i-Austauschreaktionen, bei denen neben den 20 proteino-genen Aminosäuren auch das in Bacitracin vorkommende Ornithin getestet wurde, konnte gezeigt werden, daß BacA1-AT spezifisch Ile aktiviert und daß BacA2-AT selektiv Cys adenyliert. Diese Daten entsprechen exakt dem Erwartungswert und verifizieren somit die postulierte Domänenorganisation des *bac*-Operons. Die für BacA1-AT ermittelten leichten Nebenspezifitäten für hydrophobe Aminosäuren, spiegeln die in natürlichen Bacitracin-Präparationen auftretenden Gemische verschiedener Varianten wider. Eine der am häufigsten auftretenden Varianten stellt hierbei das Bacitracin B dar, bei welchem an verschiedenen Positionen (1, 5 und/oder 8) Ile gegen Val substituiert sein kann [Morris, 1994].

In analogen Experimenten mit dem Doppelmodulprotein BacA1-2 zeigte sich, daß die ermittelten Substratspezifitäten exakt denen der Einzelmodulproteine entsprachen. Zur Untersuchung der Aktivität des BacA1-2 Proteins wurden quantitative, vergleichende Analysen mit den Einzelmodulproteinen bezüglich der Adenylierungseigenschaften durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Proteine BacA1/2-AT und BacA1-2 nahezu identische Bindungsaffinitäten für ihre Substrate aufwiesen und belegen daher die funktionelle Integrität des ersten heterolog, in löslicher Form expremierten PPS-Doppelmodulproteins. Ferner zeigen diese Ergebnisse, daß die Aktivitäten von A-Domänen unabhängig von dem sie umgebenden Proteinverband sind und dokumentieren somit die funktionelle Eigenständigkeit der PPS-A-Domänen [Marahiel *et al.*, 1997].

6.2.2 Posttranslationale Modifikation mit 4'-PAN und Thiolierung

Frühere Untersuchungen an heterolog expremierten PPS-Modulen zeigten, daß der Anteil, der durch die *E. coli* Holo-ACP-Synthase mit 4'-PAN modifizierten Proteine, sehr gering war [Gocht & Marahiel, 1994; Lambalot *et al.*, 1996]. Daher wurde angenommen, daß dieses Enzym, welches normalerweise das ACP des *E. coli* Fettsäure-Synthasekomplexes modifiziert [Lambalot *et al.*, 1995], PPS-Module nicht oder in nur sehr geringem Maße als

Substrate erkennt. Aus diesem Grund wurden die rekombinanten Proteine BacA1-AT, BacA2-AT und BacA1-2 *in vitro* mit der 4'-PAN-Transferase Sfp des Surfactin Biosynthesesystems aus *B. subtilis* modifiziert. Für dieses Enzym konnte vor kurzem gezeigt werden, daß es neben den SrfA-T-Domänen auch T-Domänen heterologer PPS-Systeme als Substrat akzeptiert und effektiv mit 4'-PAN belädt [Quadri *et al.*, 1998; Weinreb *et al.*, 1998]. Durch [³H]-CoA- und TCA-Präzipitationsexperimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Sfp die T-Domänen der BacA-Modulproteine zu ca. 40 % mit 4'-PAN modifiziert. Dieser Wert entspricht in etwa 45 % der für SrfA-T-Domänen ermittelten Beladungseffizienz [Weinreb *et al.*, 1998] und korreliert in guter Übereinstimmung mit den Daten anderer heterologer T-Domänen [Quadri *et al.*, 1998].

Nachfolgend wurden die posttranslational modifizierten BacA-Modulproteine auf die Fähigkeit untersucht, ihre Substrataminosäuren kovalent als Thioester zu binden. Hierzu wurden [¹⁴C]-Ile- bzw. [³⁵S]-Cys-Beladungs- und TCA-Präzipitationsexperimente durchgeführt. Die bezüglich der 4'-PAN-Modifikation ermittelten relativen Beladungswerte von durchschnittlich 83 bis 91 % dokumentieren die hohe Effizienz der Thiolierungsreaktion [Weinreb *et al.*, 1998]. Ähnlich wie bei der Adenylierung zeigten die Einzel- und Doppelmodulproteine auch in diesen Untersuchung nahezu identische Eigenschaften, so daß die funktionelle Aktivität des Doppelmodulproteins auch in Bezug auf seine Thiolierungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte.

In weiterführenden Experimenten wurden die [¹⁴C]-Ile-Thiolierungseigenschaften von BacA1-2 in Gegenwart der zweiten Substrataminosäure Cys näher untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß nach einer Präinkubation des Proteins mit [¹⁴C]-Ile durch die Zugabe von nicht radioaktiv markiertem Cys eine stetige Abnahme der enzymgebundenen Radioaktivität induziert wurde. Diese Daten führten zur Formulierung des in Abbildung 5-16 dargestellten Modells. Demnach wird BacA1-2 zunächst mit seinen beiden Substrataminosäuren kovalent beladen, welche dann unter Ausbildung eines enzymgebundenen Dipeptides miteinander reagieren. Dieses als Thioester gebundene Dipeptid wird dann durch eine unkatalysierte hydrolytische Thioesterspaltung vom Enzym abgetrennt. Da die entstehenden Produkte nicht mehr als Substrate der BacA1-2 A-Domänen erkannt werden, nimmt im Laufe der Reaktion die enzymgebundene Radioaktivität rasch ab. Ähnliche Beobachtungen wurden vor kurzem auch von einem anderen PPS-Dimodulsystem berichtet, das sich aus rekombinantem GrsA und einem TycB1-Modulprotein 'ProCAT' (bestehend aus C-, A- und T-Domäne) zusammensetzt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Diese beiden Enzyme katalysieren in Gegenwart ihrer Substrataminosäuren Phe (GrsA) und Pro (ProCAT) die Bildung des Dipeptides Phe-Pro. Wurden beide Enzyme zunächst getrennt mit ihren Substrataminosäuren beladen, wobei radioaktiv markiertes [¹⁴C]-Phe verwendet wurde, so konnte nach dem Mischen beider Enzyme anfänglich eine Verdopplung und nachfolgend eine rasche Abnahme der enzymgebundenen Radioaktivität detektiert werden. Die Ursache für dieses Verhalten wird dadurch erklärt, daß das an GrsA gebundene [¹⁴C]-Phe unter Ausbildung eines Dipeptides auf ProCAT übertragen und die hierdurch frei gewordene T-Domäne von GrsA abermals mit [¹⁴C]-Phe beladen wird. So daß die absolute Menge an präzipitierbarer Radioaktivität verdoppelt wird. Die nachfolgende Abnahme der Beladung resultiert aus einer autokatalytischen Abspaltung des Phe-Pro-Peptides unter Ausbildung eines Diketopiperazins. Somit weisen die beiden Systeme BacA1-2 und GrsA/ProCAT in Gegenwart ihrer beiden Substrataminosäuren ein ähnliches Thiolierungsverhalten auf, das die Annahme einer homologen Reaktionssequenz

nahelegt. Die im GrsA/ProCAT-System detektierte anfängliche Verdopplung der Beladung mit der 'ersten' Aminosäure ist bei BacA1-2 jedoch nicht zu detektieren. Die Gründe hierfür könnten in der unterschiedlichen Domänenorganisation beider Systeme liegen. So enthält BacA1-2 beide Module auf einer einzigen Polypeptidkette, wohingegen bei GrsA/ProCAT die Module auf zwei, voneinander getrennten Proteinen vorliegen. Aber auch Effekte, die auf spezifische Unterschiede zwischen C- und Z-Domänen zurückzuführen sind, können nicht ausgeschlossen werden (s. u.).

6.2.3 Analyse der von BacA1-2 gebildeten Produkte

Die von BacA1-2 in Gegenwart beider Aminosäuren gebildeten Produkte wurden mit Hilfe von Radio-DC und *Reversed Phase* HPLC eingehend charakterisiert. Hierdurch konnte die Fähigkeit des Doppelmodulproteins nachgewiesen werden, seine beiden Substrataminosäuren Ile und Cys unter Ausbildung einer Peptidbindung miteinander zu verknüpfen. Das anhand der Domänenorganisation von BacA1-2 zu erwartende Reaktionsprodukt eines thiazolinhaltigen Ile-Cys-Dipeptides konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Gründe hierfür sind noch unklar. Daher soll nun nachfolgend das BacA1-2 Protein detailliert mit dem im vorangegangenen Kapitel beschriebene Yersiniabactin-YbtE/HMWP2-System verglichen werden, für das eine *in vitro* Thiazolinringbildung nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 6-1) [Gehring *et al.*, 1998].

Die beiden Systeme YbtE/HMWP2 und BacA1-2 wurden heterolog in vergleichbaren *E. coli* Stämmen expremiert und über eine analoge His₆-tag-Strategie aufgereinigt. Daher kann ausgeschlossen werden, daß die bei BacA1-2 ausbleibende Heterozyklenbildung auf einen, für die Zyklisierungsreaktion notwendigen, wirtsspezifischen Kofaktor zurückzuführen ist. Die Domänenausstattung beider Systeme ist sehr homolog und unterscheidet sich nur in dem Auftreten einer zusätzlichen Domäne unbekannter Funktion, welche in HMWP2 als Insertion zwischen der A- und der zweiten T-Domäne eingefügt ist. Derartige Domänen werden jedoch nicht in anderen homologen, an einer Thiazolinringsynthese beteiligten, PPS-Systemen gefunden. Daher scheint eine spezifische Rolle dieser Domäne bei der Ringbildung eher unwahrscheinlich und es kann geschlossen werden, daß die im Verhalten des YbtE/HMWP2- und BacA1-2-Systems auftretenden Unterschiede durch andere Faktoren zu erklären sind. Hierfür könnte z. B. die unterschiedliche Domänenverteilung beider Systeme in Betracht gezogen werden. So sind im Yersiniabactin-System die Domänen auf zwei Proteine verteilt, wohingegen BacA1-2 alle Domänen auf einer einzigen Polypeptidkette enthält. Jedoch muß hierbei berücksichtigt werden, daß Salicylat nach seiner Aktivierung durch YbtE kovalent als Thioester auf HMWP2 übertagen wird. Somit liegen auch in diesem System die beiden Substrate Sal und Cys als Thioester mit einem einzigen Protein verknüpft vor. Es kann angenommen werden, daß die nachfolgende Verknüpfung beider Substrate unabhängig von YbtE allein durch HMWP2 katalysiert wird. Somit läßt sich festhalten, daß beide Systeme zwar spezifische Unterschiede auf der Proteinebene aufweisen, diese jedoch nicht das Ausbleiben einer Thiazolinringbildung bei BacA1-2 nachhaltig erklären. Ein weiterer wichtiger Aspekt könnte in der unterschiedlichen Natur der funktionalisierten Substrate liegen. So ist der im Yersiniabactin-System gebildete Thiazolinring durch die Konjugation mit dem aromatischen System von Salicylat Resonanz-stabilisiert und seine Entstehung somit energetisch stark begünstigt. Eine derartige Stabilisierung ist bei einem Ile-Cys-Thiazolin nicht möglich, so daß

seine Bildung vermutlich deutlich langsamer abläuft. In diesem Zusammenhang ist das Thio-lierungsverhalten von BacA1-2 bezüglich der ersten Aminosäure Ile von besonderem Interesse. Wie oben ausgeführt wurde, ist durch eine Cys-Zugabe keine Erhöhung der Ile-Be-ladung zu detektieren, wie es bei eigenständig agierenden PPS-Modulen eigentlich zu erwarten wäre [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Dieser Befund deutet darauf hin, daß das BacA1-2 Protein nach Bildung des linearen Dipeptides in einer Konformation varharrt, in der eine Kommuni-kation zwischen beiden Modulen aufrecht erhalten bleibt. Dies entspricht der vor kurzem postulierten Theorie, nach der die 4' -PAN-Arme drei mögliche Stellungen einnehmen können [De Crecy-Lagard *et al.*, 1995; Stachelhaus *et al.*, 1996b; Stein *et al.*, 1996]: In der ersten Position wird der Kofaktor mit der entsprechenden Aminosäure beladen (Beladungs-Position); in der zweiten Position interagiert dieser Arm mit dem vorherigen Kofaktor und übernimmt von diesem die wachsende Peptidkette (Akzeptor-Position) und in der dritten Position reicht der Arm die nun um eine Aminosäure verlängerte Peptidkette an den Arm des nächsten Moduls weiter (Donor-Position). Die vorliegenden experimentellen Daten deuten somit darauf hin, daß nach der Bildung des Ile-Cys-Dipeptides der 4' -PAN-Kofaktor des ersten BacA1-2-Moduls in der Donor-Position und der zweite Kofaktor in der Akzeptor-Position fixiert werden. Dies könnte bedeuten, daß die normalerweise zwischen den beiden Modulen ablaufende Reaktion, nämlich die Ausbildung eines Thiazolinringes, nicht abge-schlossen ist. Nach dieser Interpretation erscheint es möglich, daß, obwohl BacA1-2 alle für die Thiazolinringbildung wichtigen katalytischen Einheiten besitzt, die Zyklisierungsreaktion kinetisch inhibiert ist. Die Gründe hierfür könnten in der verkürzten Struktur des BacA1-2 Proteins liegen, die eventuell eine optimale Orientierung aller katalytisch aktiven Reste zu-einander verhindert. Daher sollen in zukünftigen Experimenten, C-terminal verlängerte BacA1-2-Derivate erzeugt und auf ihre Fähigkeit der Heterozyklenbildung untersucht werden.

6.3 Identifizierung und Charakterisierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons

Mit Hilfe der oben beschriebenen PCR-Methode [Turgay & Marahiel, 1994] wurde in Analogie zum *bac*-Operon ein weiteres PPS-Operon aus *B. licheniformis* ATCC10716 identi-fiziert, kloniert und sequenziert. Durch die intensive Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß sich dieses System aus drei PPS zusammensetzt, deren Domänenorganisation perfekt mit der Organisation der SrfA-Synthetasen aus *B. subtilis* korreliert [Cosmina *et al.*, 1993]. Da die von *B. licheniformis* produzierten Lipopeptide mit einer Surfactin-homologen Struktur als Lichenysine bezeichnet werden (vgl. Kapitel 2.8), wurden die in dieser Arbeit identifizierte PPS-Gene als putatives *lic*-Operon charakterisiert. Diese Interpretation wurde nachhaltig durch die vor kurzem publizierte Sequenz eines PPS-Systems (*lchAA-C*) aus dem Lichenysin A Produzenten *B. licheniformis* BNP29 untermauert [Yakimov *et al.*, 1998]. Tatsächlich weisen die von dem *lic*- und *lchA*-System kodierten Proteine ca. 95 % Identität zueinander auf, wodurch angezeigt wird, daß beide Systeme Stamm-spezifische Variationen desselben Biosynthese-Apparates darstellen.

Alle bisher charakterisierten Lichenysine besitzen die allgemeine Sequenz Glx-Leu-DLeu-Val-Asx-DLeu-Ile/Leu/Val, die lediglich Variationen an der ersten, fünften und siebenten Aminosäureposition aufweist. Daher wurden in weiterführenden Experimenten durch Herrn Sascha Dökel die korrespondierenden A-Domänen des *lic*-Systems kloniert, heterolog

expremiert und die aufgereinigten Proteine biochemisch charakterisiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß das vom Lic-System generierte Produkt voraussichtlich die folgende Sequenz besitzt: Gln-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Ile. Entsprechend der allgemeinen Nomenklatur für Lichenysine wurde diese Verbindung als Lichenysin D bezeichnet. In diesem Zusammenhang war es interessant, daß das homologe LchA-System vermutlich Lichenysin A produziert, das an der ersten Aminosäureposition Glu und an der fünften Position Asp trägt. Daher wurden die entsprechenden A-Domänen beider Systeme intensiv miteinander verglichen. Hierbei konnten jedoch keine eindeutigen Sequenzunterschiede identifiziert werden, die die unterschiedlichen Substratspezifitäten erklären könnten. Somit bleibt unklar, ob eventuell bisher nicht charakterisierte Effekte *in vivo* eine Transformation von Lichenysin D in Lichenysin A verursachen könnten oder ob eventuell Lichenysin A auch eher Gln/Asp als Glu/Asn an den entsprechenden Positionen enthält.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte die Produktion eines hämolytisch aktiven Lichenysins nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund korrespondiert mit den in der Literatur dokumentierten Eigenschaften von *B. licheniformis* ATCC 10716. So wurde dieser Stamm als Bacitracin-Produzent seit mehreren Jahrzehnten intensiv auf seine Fähigkeit Peptide zu produzieren untersucht [Ishihara *et al.*, 1968; Frøyskov, 1974]. Dennoch wurde bisher nie die Produktion eines Lipopeptides berichtet. Daher ist davon auszugehen, daß dieser Stamm tatsächlich einen Lichenysin-negativen Phänotyp aufweist. Die Gründe hierfür können vielfältiger Natur sein. Ähnliche 'stille' PPS-Gene sind auch aus anderen *Bacillus*-Stämmen berichtet worden [Nakano *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1995; Tognoni *et al.*, 1995]. Das am besten untersuchte Beispiel repräsentiert *B. subtilis* JH642. Dieser Stamm weist einen Surfactin-negativen Phänotyp, der auf das Fehlen einer intakten 4' -PAN-Transferase (Sfp) zurückgeführt werden konnte. Eine analoge Ursache ist jedoch für *B. licheniformis* ATCC 10716 auszuschließen, da dieser Stamm nachweislich über die aktive 4' -PAN-Transferase Bli verfügt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte sogar gezeigt werden, daß Bli in der Lage ist, in einer *in trans* Komplementation die Surfactin-Synthese in *B. subtilis* JH642 zu induzieren. Somit ist insbesondere aufgrund der hohen Homologie des SrfA- und Lic-Systems davon auszugehen, daß Bli auch die Lic-Synthetasen effektiv modifizieren kann. Im Rahmen der langjährigen Anstrengungen, die Bacitracin-Synthetasen zu charakterisieren, wurde bisher nie die Isolierung von PPS dokumentiert, die zu den Lic-Synthetasen korrespondieren könnten [Pfaender, 1972; Ishihara & Shimura, 1974; Frøyskov, 1984]. Daher scheint die wahrscheinlichste Ursache für den Lichenysin-negativen Phänotyp von ATCC 10716 auf transkriptioneller Ebene zu liegen.

6.4 Die 4'-PAN-Transferase Bli

Anhand der bekannten DNA-Sequenz des *bli*-Gens, das für eine 4' -PAN-Transferase aus *B. licheniformis* (Stamm 1001) kodiert [Gaidenko & Khaikinson, 1988], konnte das homologe Gen aus *B. licheniformis* ATCC10716 über PCR amplifiziert, kloniert und heterolog als His₆-tag-Fusion expremiert werden. Das bis zur Homogenität aufgereinigte Protein wurde nachfolgend für *in vitro* Modifikationsreaktionen an den rekombinanten BacA-Modulproteinen eingesetzt, wodurch die funktionelle Aktivität von Bli nachgewiesen werden konnte. Die im Vergleich zum Sfp-Protein reduzierte Aktivität ist hierbei ursächlich auf die verminderte Löslichkeit des rekombinanten Bli-Proteins zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen

wurden zuvor auch an der 4' -PAN-Transferase Gsp des Grs-Operons gemacht, welches in *E. coli* ausschließlich in unlöslicher Form expremiert werden konnte [Borchert *et al.*, 1994]. Durch eine *in trans* Komplementation der *sfp⁰* Mutante *B. subtilis* JH642 konnte dagegen gezeigt werden, daß natives Bli *in vivo* eine zu Sfp vergleichbare Aktivität besitzt.

7 Anhang

7.1 Domänenstruktur sequenzierter PPS-Gene und Struktur der synthetisierten Produkte

Tabelle 7-1 Domänenstruktur sequenzierter PPS-Gene und Struktur der synthetisierten Produkte.

I) Für die Darstellung der Domänenorganisation von PPS-Genen wurde der folgende Farbkode verwendet: **A**, Adenylierungsdomäne (156x); **T**, Thioesterbindungsdomäne (160x); **C**, Kondensationsdomäne (128x); **M**, N-Methylierungsdomäne (10x); **E**, Epimerisierungsdomäne (31x); **Z**, Zyklisierungsdomäne(4x); **Te**, Thioesterasedomäne (15x); **Red**, Reduktionsdomäne (4x); **OxZ**, Oxidative Zyklisierung von Ile (1x). Unter den jeweiligen A-Domänen sind die bekannten oder postulierten Substrate angegeben

II) Zur Kennzeichnung modifizierter Aminosäuren sind den entsprechenden Abkürzungen Präfixe vorangestellt: **D**-Präfix = D-Konfiguration, **M**-Präfix = N-Methylierung; **xh** = Hydroxylierung an Position x bezüglich des α -Carbonsäure-Kohlenstoffatoms und **xm** = Methylierung an Position x bezüglich des α -Carbonsäure-Kohlenstoffatoms.

III) Amino- oder Hydroxysäuren, die nicht über Peptidbindungen verknüpft sind, wurden in den Abbildungen der Primärstrukturen gekennzeichnet: **e** = Esterbindung, **i** = Verknüpfung über die Carboxyfunktion einer Aminosäureseitenkette und **c** = Verknüpfung unter Ausbildung eines fünfgliedrigen Heterozyklus (z. B. Thiazolin).

IV) Für die Beschreibung ungewöhnlicher Amino-, Hydroxy- und Carbonsäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet: **3hPic** = 3-Hydroxyl- α -Picolinsäure, **4ClThr** = 4-Chlor-L-Threonin, **4nAbu** = 2,4-Diamino-Buttersäure, **4oPip** = 4-Oxo-L-pipecolinsäure, **5hfOrn** = N^5 -Hydroxyl- N^5 -formyl-L-Ornithin, **Aad** = α -Aminoadipinsäure, **Abu** = α -Aminobuttersäure, **AcDMPt** = N-Acetyl-demethylphosphinotricin, **Aeo** = 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxidecansäure, **Bmt** = (4R)-4-[(4E)-2-Butenyl]-4-methyl-L-Threonin, **c5hOrn** = cyclo- N^5 -Hydroxyl-L-Ornithin, **Dha** = Dehydro-Alanin, **DHB** = 2,3-Dihydroxybenzoat, **DHPG** = 3,5-Hydroxyl-L-Phenylglycine, **Dht** = Dhydro-Threonin, **DMAP** = N-Methyl-(4)-dimethylamino-L-Phenylalanin, **DMAP** = 4-Dimethylamino-L-Phenylalanin, **FA** = Fettsäure, **HIV** = 2-Hydroxyl-isovaleriansäure, **HPG** = 4-Hydroxyl-L-Phenylglycin, **NAG** = N-Acetylglucosamin, **Orn** = L-Ornithin, **PGly** = L-Phenylglycin, **Pip** = L-Pipecolinsäure, **Sal** = Salicylat, **ZAddal** = (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diensäure.

wurden zuvor auch an der 4'-PAN-Transferase Gsp des Grs-Operons gemacht, welches in *E. coli* ausschließlich in unlöslicher Form expremiert werden konnte [Borchert *et al.*, 1994]. Durch eine *in trans* Komplementation der *sfp*⁰ Mutante *B. subtilis* JH642 konnte dagegen gezeigt werden, daß natives Bli *in vivo* eine zu Sfp vergleichbare Aktivität besitzt.

7 Anhang

7.1 Domänenstruktur sequenzierter PPS-Gene und Struktur der synthetisierten Produkte






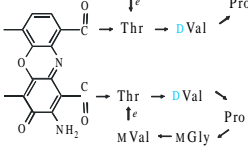


















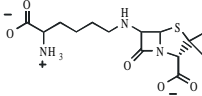














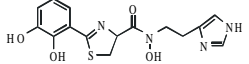





















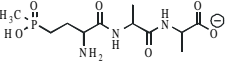





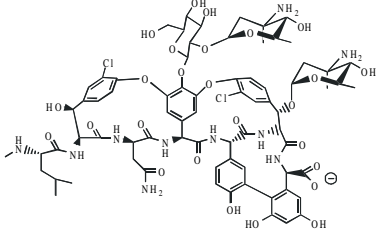








Tabelle 7-1 Domänenstruktur sequenzierter PPS-Gene und Struktur der synthetisierten Produkte.

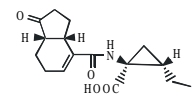
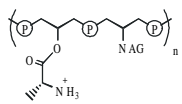
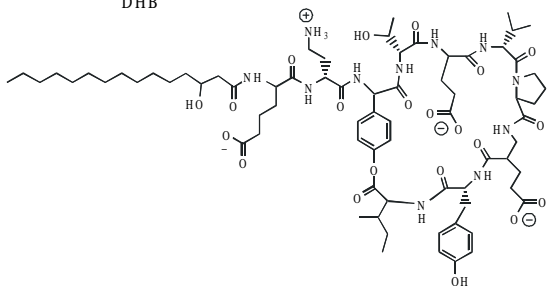
I) Für die Darstellung der Domänenorganisation von PPS-Genen wurde der folgende Farbkode verwendet: **A**, Adenylierungsdomäne (156x); **T**, Thioesterbindungsdomäne (160x); **C**, Kondensationsdomäne (128x); **M**, N-Methylierungsdomäne (10x); **E**, Epimerisierungsdomäne (31x); **Z**, Zyklisierungsdomäne(4x); **Te**, Thioesterasedomäne (15x); **Red**, Reduktionsdomäne (4x); **OxZ**, Oxidative Zyklisierung von Ile (1x). Unter den jeweiligen Adomänen sind die bekannten oder postulierten Substrate angegeben

II) Zur Kennzeichnung modifizierter Aminosäuren sind den entsprechenden Abkürzungen Präfixe vorangestellt: **D**-Präfix = D-Konfiguration, **M**-Präfix = N-Methylierung; **xh** = Hydroxylierung an Position x bezüglich des α -Carbonsäure-Kohlenstoffatoms und **xm** = Methylierung an Position x bezüglich des α -Carbonsäure-Kohlenstoffatoms.

III) Amino- oder Hydroxysäuren, die nicht über Peptidbindungen verknüpft sind, wurden in den Abbildungen der Primärstrukturen gekennzeichnet: **e** = Esterbindung, **i** = Verknüpfung über die Carboxyfunktion einer Aminosäureseitenkette und **c** = Verknüpfung unter Ausbildung eines fünfgliedrigen Heterozyklus (z. B. Thiazolin).

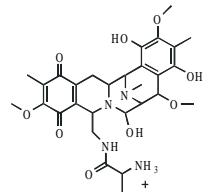
IV) Für die Beschreibung ungewöhnlicher Amino-, Hydroxy- und Carbonsäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet: **3hPic** = 3-Hydroxyl- α -Picolinsäure, **4ClThr** = 4-Chlor-L-Threonin, **4nAbu** = 2,4-Diamino-Buttersäure, **4oPip** = 4-Oxo-L-pipecolinsäure, **5hfOrn** = N⁵-Hydroxyl-N⁵-formyl-L-Ornithin, **Aad** = α -Aminoadipinsäure, **Abu** = α -Aminobuttersäure, **AcDMPt** = N-Acetyl-demethylphosphinotricin, **Aeo** = 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxidecansäure, **Bmt** = (4R)-4-[(4E)-2-Butenyl]-4-methyl-L-Threonin, **c5hOrn** = cyclo-N⁵-Hydroxyl-L-Ornithin, **Dha** = Dehydro-Alanin, **DHB** = 2,3-Dihydroxybenzoat, **DHPG** = 3,5-Hydroxyl-L-Phenylglycine, **Dht** = Dhydro-Threonin, **DMAP** = N-Methyl-(4)-dimethylamino-L-Phenylalanin, **DMAP** = 4-Dimethylamino-L-Phenylalanin, **FA** = Fettsäure, **HIV** = 2-Hydroxyl-isovaleriansäure, **HPG** = 4-Hydroxyl-L-Phenylglycin, **NAG** = N-Acetylglucosamin, **Orn** = L-Ornithin, **PGly** = L-Phenylglycin, **Pip** = L-Pipecolinsäure, **Sal** = Salicylat, **ZAddal** = (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diensäure.

Produkt	Organismus	Gen	Organisation	Accession	Lit.	Primärstruktur des Produktes
A45145	<i>Streptomyces fradiae</i>	<i>cps-1</i>	...  →  ... ? → ?	AF016696	[Hosted <i>et al.</i> , 1998]	$\text{Fa} \rightarrow \text{Trp} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow 3\text{hAsn} \rightarrow \text{Thr} \rightarrow \text{MGly} \rightarrow \text{Ala} \rightarrow \text{Asp} \rightarrow \text{Lys}$ $\text{Ile} \leftarrow 3\text{mGlu} \leftarrow \text{Asn} \leftarrow \text{Gly} \leftarrow \text{OmAsp}$
Actinomycin	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	<i>acmB</i>	 →  Thr → 	AF047717	[Schauwecker <i>et al.</i> , 1998]	
ACV	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>acvA</i>	 →  →  →  Aad → Cys → 	X54853	[MacCabe <i>et al.</i> , 1991]	Aad → Cys → 
ACV	<i>Nocardia lactamdurans</i>	<i>pcbAB</i>	 →  →  →  Aad → Cys → 	X57310	[Wilson <i>et al.</i> , 1994]	Aad → Cys → 
ACV	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>pcbAB</i>	 →  →  →  Aad → Cys → 	M54296	[Smith <i>et al.</i> , 1990]	Aad → Cys →  
ACV	<i>Acremonium chrysogenum</i>	<i>pcbAB</i>	 →  →  →  Aad → Cys → 	P25464	[Gutierrez <i>et al.</i> , 1991]	Aad → Cys → 
ACV	<i>Lysobacter lactamgenus</i>	<i>pcbAB</i>	 →  →  →  Aad → Cys → 	D50308	[Kimura <i>et al.</i> , 1996]	Aad → Cys → 
Anguibactin	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>angR</i>	 ? Cys	P19828	[Tolmasky <i>et al.</i> , 1993]	Aad → Cys →  DHB ↔ Cys → HHA 
Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>bacA</i>	 →  →  →  →  Ile → Cys → Leu →  → Ile	AF007865	[Konz <i>et al.</i> , 1997]	Ile ↔ Cys → Leu →  → Ile → Lys →  → Ile → Phe
		<i>bacB</i>	 →  Lys → 			Pt → Ala → Ala Asn ↔  ↔ His
		<i>bacC</i>	 →  →  →  →  →  Ile →  → His →  → Asn			
Bialaphos	<i>Strptomyces viridochromogenes</i>	<i>phsA</i>	 AcDMPT	X65195	[Grammel <i>et al.</i> , 1998; Schwartz <i>et al.</i> , 1996]	
Chloroeremomycin	<i>Amicolatopsis orientalis</i>	PCZA 363.3	 →  →   → 	AJ223999	[van Wageningen <i>et al.</i> , 1998]	
		PCZA 363.4	 →  →   →  → Tyr			
		PCZA 363.5	 →  →  DHPG			

Produkt	Organismus	Gen	Organisation	Accession	Lit.	Primärstruktur des Produktes
Coronatine	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>cmaA</i>	OxZ→ AT Ile	U14657	[Ulrich <i>et al.</i> , 1994]	
Cyclosporin A	<i>Tolypcladium inflatum</i>	<i>cssA</i>	AT → CAMT → CAMT → CAMT → CAMT → CAT D Ala→MLeu→MLeu→MVal→MBmt→Avu → CAMT → CAMT → CAT → CAMT → CAT →MGly→MLeu→Val→MLeu→Ala	Z28383	[Weber <i>et al.</i> , 1994]	$\begin{array}{ccccccc} \text{DAla} & \rightarrow & \text{MLeu} & \rightarrow & \text{MVal} & \rightarrow & \text{MBmt} \\ \uparrow & & & & & & \downarrow \\ \text{Ala} & \leftarrow & \text{MLeu} & \leftarrow & \text{Val} & \leftarrow & \text{MLeu} \leftarrow \text{MGly} \leftarrow \text{Abu} \end{array}$
D-Alanin-Teichonsäure	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>dae</i> bzw. <i>dltA</i>	A D Ala	M83993 U43894	[Debabov <i>et al.</i> , 1996; Heaton <i>et al.</i> , 1992]	
D-Alanin-Teichonsäure	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>glgI</i> bzw. <i>dltA</i>	A D Ala	AF049357 AF051356	[Spatafora <i>et al.</i> , 1995]	
Daptomycin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	-	... CAT → C ... (?) ... T → CATE → CA ... (?) (?)	AF021263 AF021262	[McHenney <i>et al.</i> , 1998]	$\begin{array}{ccccccccccc} \text{FA} & \rightarrow & \text{Trp} & \rightarrow & \text{Asn} & \rightarrow & \text{Asp} & \rightarrow & \text{Thr} & \rightarrow & \text{Gly} & \rightarrow & \text{Orn} & \rightarrow & \text{Asp} & \rightarrow & \text{DAla} \\ & & & & & & \uparrow_e & & & & & & & & & & \downarrow \\ & & & & & & \text{Kyn} & \leftarrow & 3\text{mGlu} & \leftarrow & \text{DSer} & \leftarrow & \text{Gly} & \leftarrow & \text{Asp} \end{array}$
2,3-Dihydroxy-benzoylglycin	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>dhbE</i> <i>dhbF</i>	A DHB CAT → C ? Gly	U26444 Z99120	[Kunst <i>et al.</i> , 1997; Rowland <i>et al.</i> , 1996]	DHB → Gly
Enniatin	<i>Fusarium scirpi</i>	<i>esynI</i>	AT → CAMT → TC ? D HIV→MVAL	Z18755	[Haese <i>et al.</i> , 1993]	$\begin{array}{ccc} \text{DHIV} & \rightarrow & \text{MVal} \xrightarrow{\text{e}} \text{DHIV} \\ \uparrow_e & & \downarrow \\ \text{MVal} & \leftarrow & \text{DHIV} \xleftarrow{\text{e}} \text{MVal} \end{array}$
Enterobactin	<i>E. coli</i>	<i>entE</i> <i>entF</i>	A DHB CAT → Te Ser	X15058 J05325	[Rusnak <i>et al.</i> , 1989; Rusnak <i>et al.</i> , 1991]	$\begin{array}{ccc} \text{DHB} & \rightarrow & \text{Ser} \xrightarrow{\text{e}} \text{Ser} \leftarrow \text{DHB} \\ & \nwarrow \nearrow_e & \\ & \text{Ser} & \\ & \uparrow & \\ & \text{DHB} & \end{array}$
Fengycin	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>pps1</i> <i>pps2</i> <i>pps3</i> <i>pps4</i> <i>pps5</i>	CAT → CATE Glu→ D Orn CAT → CATE Tyr→ D Thr CAT → CATE Glu→ D Val CAT → CAT → CATE Pro→Glu→ D Tyr CAT → Te Ile	Z34883	[Tognoni <i>et al.</i> , 1995]	

Fengycin	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>fenE</i>		AF023465	[Chen <i>et al.</i> , 1995]	$\begin{array}{ccccccc} 3\text{hFA} \rightarrow & \text{Glu} \rightarrow & \text{DOrn} \rightarrow & \text{Tyr} \rightarrow & \text{DThr} \rightarrow & \text{Glu} \rightarrow & \text{DVal} \\ & & & \uparrow_e & & & \downarrow \\ & & & \text{Ile} \leftarrow & \text{DTyr} \leftarrow & \text{Glu} \leftarrow & \text{Pro} \end{array}$
		<i>fenA</i>		AF023464		
		<i>fenB</i>		L42523		
Ferrichrom	<i>Ustilago maydis</i>	<i>sid2</i>		U62738	[Gentil <i>et al.</i> , 1997; Mei <i>et al.</i> , 1993]	$\begin{array}{ccccc} 5\text{hfOrn} \rightarrow & 5\text{hfOrn} \rightarrow & 5\text{hfOrn} \\ & \swarrow & & \downarrow & \\ & \text{Gly} \leftarrow & \text{Gly} \leftarrow & \text{Gly} \end{array}$
Gramicidin	<i>Bacillus brevis</i>	<i>grsA</i>		X15577	[Kratzschmar, 1989 #1870; Turgay, 1992 #201]	$\begin{array}{ccccccc} \text{DPhe} \rightarrow & \text{Pro} \rightarrow & \text{Val} \rightarrow & \text{Orn} \rightarrow & \text{Leu} \\ \uparrow & & & & \downarrow \\ \text{Leu} \leftarrow & \text{Orn} \leftarrow & \text{Val} \leftarrow & \text{Pro} \leftarrow & \text{DPhe} \end{array}$
		<i>grsB</i>		X61658		
HC-Toxin	<i>Cochliobulus carbonum</i>	<i>hts1</i>		A45086	[Scott-Craig <i>et al.</i> , 1992]	
Lichenysin A	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>lchAA</i>		AJ005061	[Yahimov <i>et al.</i> , 1995; Yakimov <i>et al.</i> , 1997]	
		<i>lchAB</i>				
		<i>lchAC</i>				
Lichenysin D	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>licA</i>		U95370	[Konz <i>et al.</i> , 1998]	$\begin{array}{ccccccc} 3\text{hFA} \rightarrow & \text{Gln} \rightarrow & \text{Val} \rightarrow & \text{DLeu} \\ \uparrow_e & & & \downarrow \\ \text{Ile} \leftarrow & \text{DLeu} \leftarrow & \text{Asp} \leftarrow & \text{Val} \end{array}$
		<i>licB</i>				
		<i>licC</i>				
Lysinbiosynthese	<i>Candida albicans</i>	<i>lys2</i>		U58133	[Suvarna <i>et al.</i> , 1998]	
Lysinbiosynthese	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>lys2</i>		Z35984	[Feldmann <i>et al.</i> , 1994]	
Lysinbiosynthese	<i>Schizosaccharomyc es pombe</i>	<i>lys1+</i>		U15923	[Ford <i>et al.</i> , 1993]	
Lysobactin	<i>Lysobacter</i>	-		X96558	[Bernhard <i>et al.</i> , 1996]	$\begin{array}{ccccccc} \text{DLeu} \rightarrow & \text{Leu} \rightarrow & 3\text{hPhe} \rightarrow & 3\text{hLeu} \rightarrow & \text{Leu} \rightarrow & \text{DArg} \rightarrow & \text{Val} \\ & & & \searrow_e & & & \downarrow \\ & & & \text{Ser} \leftarrow & 3\text{hAsn} \leftarrow & \text{Gly} \leftarrow & \text{aThr} \end{array}$
Microcystin ?	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>mapep1</i>		Z28338	[Meissner <i>et al.</i> , 1996]	$\begin{array}{ccccccc} \text{DAla} \rightarrow & \text{L-aa} \rightarrow & \text{D3mAsp} \xrightarrow{i} & \text{L-aa} \\ \swarrow & & & \downarrow \\ \text{MDha} \xleftarrow{i} & \text{DGlu} \leftarrow & \text{ZAddal} \end{array}$

Produkt	Organismus	Gen	Organisation	Accession	Lit.	Primärstruktur des Produktes
Microcystin ?	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>mcyB</i>		U97078	[Dittmann <i>et al.</i> , 1997]	
Mycobactin / Exochelin ?	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>MTCY22 H8.01</i> <i>MTCY22 H8.02</i> <i>MTCY22H8.05</i> <i>MTCY27.01</i>	 Ser/Thr? Lys? → (?) Lys?	Z81371 Z95208	[Philipp <i>et al.</i> , 1996] [Bernhard, 1998]	
Peptolid	<i>Cylindrotrichum oligospermum</i>	-	 ? → ?	X96559	[de Crecy-Lagard <i>et al.</i> , 1997a]	
Pristinamycin I	<i>Sterptomyces pristinaespiralis</i>	<i>snbA</i> <i>snbC</i> <i>snbDE</i>	 3hPic Thr → Pro → MDMAP → 4oPip → PGly	X98515 Y11548	[Adams <i>et al.</i> , 1994]	
Pseudobactin	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>pbsC</i>	 (?)	X77699	[Serino <i>et al.</i> , 1997]	
Pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>pchD</i>	 Sal	X82644	[Merriman <i>et al.</i> , 1995]	
Pyoverdin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>pvdD</i>	 (?) → (?)	U07359	[Aparicio <i>et al.</i> , 1996]	
Rapamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>rapP</i>	 Pip	X86780		

Saframycin Mx1	<i>Myxococcus Xanthus</i>	<i>safB</i>	<div>AT→CAT</div> <div>Ala→Gly</div> <div>CAT→CAT→Red</div> <div>Tyr→Tyr</div>	U24657	[Pospiech <i>et al.</i> , 1996]	
Streptothricin	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>sttA</i>	<div>A</div> <div>(?)</div>	Y10293	[Fernandez-Moreno <i>et al.</i> , 1997]	
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>srfA-A</i>	<div>CAT→CAT→CATE</div> <div>Glu→Leu→DLeu</div>	X70356	[Cosmina <i>et al.</i> , 1993]	<div>3hFA → Glu → Val → DLeu</div> <div>↑_e</div> <div>Leu ← DLeu ← Asp ← Val</div>
		<i>srfA-B</i>	<div>CAT→CAT→CATE</div> <div>Val→Asp→DLeu</div>			
		<i>srfA-C</i>	<div>CAT→Te</div> <div>Leu</div>			
Syringomycin	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>syrB</i>	<div>AT</div> <div>(?)</div>	U88574	[Zhang <i>et al.</i> , 1995]	<div>3hFA → Ser → DSer → 4nAbu → D4nAbu</div> <div>↑_e</div> <div>4C1Thr ← 3hAsp ← Dht ← Arg</div>
Tyrocidin	<i>Bacillus brevis</i>	<i>tycA</i>	<div>ATE</div> <div>DPhe</div>	AF-0048435	[Mootz <i>et al.</i> , 1997]	<div>DPhe → Pro → Phe → DPhe → Asn</div> <div>↑</div> <div>Leu ← Orn ← Val ← Tyr ← Glu</div>
		<i>tycB</i>	<div>CAT→CAT→CATE</div> <div>Pro→Phe→DPhe</div>			
		<i>tycC</i>	<div>CAT→CAT→CAT→CAT→CAT→CAT→Te</div> <div>Asn→Glu→Tyr→Val→Orn→Leu</div>			
Virginiamycin S	<i>Streptomyces virginiae</i>	<i>snbDE</i>	<div>...AT→CAM...</div> <div>Pro→MDMAP</div>	Y11547	[de Crecy-Lagard <i>et al.</i> , 1997b]	<div>3hPic → Thr → DAbu → Pro</div> <div>↙_e</div> <div>PGly ← 4oPip ← MPGly</div>
Yersiniabactin	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>irp5</i>	<div>A</div> <div>Sal</div>	L18881	[Guilvout <i>et al.</i> , 1993; Pelludat <i>et al.</i> , 1998]	
		<i>irp2</i>	<div>TZ→A(?)T→ZT</div> <div>Cys</div>	Y12527		
Yersiniabactin	<i>Yersinia pestis</i>	<i>ybtE</i>	<div>A</div> <div>Sal</div>	U22966	[Bearden <i>et al.</i> , 1997]	
?	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>pksorfx5</i>	<div>A</div> <div>(?)</div>	U11039	[Philipp <i>et al.</i> , 1996]	
		<i>pksorfx6</i>	<div>CAT→PKS</div> <div>(?)</div>	AL009126		
?	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	<i>aps</i>	<div>?→CAT...?</div> <div>(?)</div>	X97860	[Albertini <i>et al.</i> , 1995; Scotti <i>et al.</i> , 1993]	

Produkt	Organismus	Gen	Organisation	Accession	Lit.	Primärstruktur des Produktes
?	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTCY2251.20	CAT → CAT (?) → (?)	Z74410	[Pelzer <i>et al.</i> , 1997]	
?	<i>Bacillus subtilis</i>	yngI	A (?)	AL009126	[Philipp <i>et al.</i> , 1996]	
?	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	PCZA 361.18	AT ?	AJ223998	[Kunst <i>et al.</i> , 1997]	
?	<i>Metarhizium anisopliae</i>	pesA	ATE → CAT → CAT → CATE ? → ? → ? → ?	X89442	[van Wageningen <i>et al.</i> , 1998]	
?	<i>Streptomyces coelicolor</i>	St3F7.11	A (?)	AL021409	[Bailey <i>et al.</i> , 1996]	
?	<i>Bacillus subtilis</i>	yukL	A (?)	Z82015	[Redenbach <i>et al.</i> , 1996] [Oudega <i>et al.</i> , 1997]	

7.2 Sequenz der über PCR amplifizierten Fragmente PCR01 und PCR05

DNA-Sequenz von PCR01 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.

```

1  TAC CGG ACG GGG GAT CGG GTG CGC CGT CTT CCG AAT GGG GAG ATT GAA
   Y  R  T  G  D  R  V  R  R  L  P  N  G  E  I  E

49  TTT TTA GGG CGG ACG GAT GAT CAG GTG AAA ATC CGC GGC TAC AGA ATC
   F  L  G  R  T  D  D  Q  V  K  I  R  G  Y  R  I

97  GAA TTG AAA GAA ATT GAA GAG GCC TTC ATT GGA CTT GAA CAT ATA GAG
   E  L  K  E  I  E  E  A  F  I  G  L  E  H  I  E

145  AGA GCG GTC GTT CTT TCA TTT ACG GCT GAC TCA GGG CTA GAC GAA CTG
   R  A  V  V  L  S  F  T  A  D  S  G  L  D  E  L

193  TGC GCT TAT ATT CAA GCG AAA CGA CAG CTG CCG GTT CCC GAA ATG AGA
   C  A  Y  I  Q  A  K  R  Q  L  P  V  P  E  M  R

241  GAG CGT CTT TCT GAG CGG CTT CCG TCG TAC ATG ATC CCG TCA TAT TTC
   E  R  L  S  E  R  L  P  S  Y  M  I  P  S  Y  F

289  GTA ACG GTG GAT AAA ATG CCG CTT GCG AAC GGA AAA GTG GAC CGC AGC
   V  T  V  D  K  M  P  L  A  N  G  K  V  D  R  S

337  GCC TGC GGA GCC GCA AGT CTA AGT GGT CAA AGC GAT TCA TAT AGA GCG
   A  C  G  A  A  S  L  S  G  Q  S  D  S  Y  R  A

385  CCG TCA ACC GAA TTT GAA AAA GCC CTC TGC GGC ATT TGG GAG GAG GTG
   P  S  T  E  F  E  K  A  L  C  G  I  W  E  E  V

433  CTT GGC GTT CGG CCG GTC GGA CTT GAC GAC AAT TTC TTC CCC CCC GGC
   L  G  V  R  P  V  G  L  D  D  N  F  F  P  P  G

481  GGC GAC TCC TT
      G  D  S

```

DNA-Sequenz von PCR05 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.

```

1  TAT AAA ACG GGA GAC TTG GCA AGG TGG CTG CCT GAT GGA AAT GTC GAA
   Y  K  T  G  D  L  A  R  W  L  P  D  G  N  V  E

49  TTC CTC GGG AGA ATC GAT CAC CAA GTC AAG ATT CGC GGT TTC AGA ATC
   F  L  G  R  I  D  H  Q  V  K  I  R  G  F  R  I

97  GAA ACC GGC GAA ATT GAA ACG AAG CTT TTG GAA AAT CAA AAC ATC AGC
   E  T  G  E  I  E  T  K  L  L  E  N  Q  N  I  S

145  GAA GCT GTC GTT ATA GAC CGG GAA GAT AAG AAA GGA CAT AAG TAC CTG
   E  A  V  V  I  D  R  E  D  K  K  G  H  K  Y  L

```

```

193  TGC GCC TAT ATT GTC GCT CGA GCG AAA ACA AAC ACA AAT GAA CTG AGG
      C  A  Y  I  V  A  R  A  K  T  N  T  N  E  L  R

241  GAA TAT TTG TCC GAT CAC TTA CCG GAC TAT ATG CTC CCT TCC TAT TTT
      E  Y  L  S  D  H  L  P  D  Y  M  L  P  S  Y  F

289  ATT CAA ATC AAC AAG ATG CCT CTC ACA CCA AAC GGA AAG ATC GAT CGA
      I  Q  I  N  K  M  P  L  T  P  N  G  K  I  D  R

337  AAA GCG CTT CCT GAA CCT GCC GGA GAC GTC ATA GCG GCA AGC GGA TAT
      K  A  L  P  E  P  A  G  D  V  I  A  A  S  G  Y

385  GAA GCG CCG CGT AAT GAA ACG GAA GAA AAG CTG GCC GCT GTT TGG CAG
      E  A  P  R  N  E  T  E  E  K  L  A  A  V  W  Q

433  GAA GTG CTG GAC AGG GAC AAA ATC GGA ATC AAC GAT AAT TTT TTT GAA
      E  V  L  D  R  D  K  I  G  I  N  D  N  F  F  E

481  ATC GGG GGA GAT TCA ATT
      I  G  G  D  S  I

```

7.3 Sequenzen der *bli*-Gene aus *B. licheniformis*

DNA-Sequenz von *bli* aus *B. licheniformis* Stamm 1001 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz [Gaidenko & Khaikinson, 1988].

```

1   ATG AAG ATT TAC GCC GTT TAT ATG GAT CGC CCG GAA GCC GGC CAA TTT
      M  K  I  Y  A  V  Y  M  D  R  P  E  A  G  Q  F

49  AAC CGA ATG ATG GCC ATG GTC TCT GAA GAA AAG CGC AAA AAA GTG GGC
      N  R  M  M  A  M  V  S  E  E  K  R  K  K  V  G

97  AGA TAC AGA TAT CCC GAA GAT GCC AGC AGG ACG CTG ATC GGG GAA GTG
      R  Y  R  Y  P  E  D  A  S  R  T  L  I  G  E  V

145 CTG GCG AGG CAC ATC ATC AGT GAA ACG TTT CAT TTA CCG AAC GAT CAG
      L  A  R  H  I  I  S  E  T  F  H  L  P  N  D  Q

193 ATC CGT TTT ACG GAA GGA AGG TAC GGC AAA CCG GCT GCT GAA GGT CTG
      I  R  F  T  E  G  R  Y  G  K  P  A  A  E  G  L

241 ACG ACT GTT CAT TTC AAC ATT TCC CAC TCC GGA AAC TGG ATC GTG TGC
      T  T  V  H  F  N  I  S  H  S  G  N  W  I  V  C

289 GGA GCT GGC ACC AAT CCG ATC GGA GTG GAT GTC GAA AAA ATC AAG CCG
      G  A  G  T  N  P  I  G  V  D  V  E  K  I  K  P

337 ATC AAT TTC GAC ATT GCC GAG CGG TTT TTT TCT CCT TCA GAG CAC CAT
      I  N  F  D  I  A  E  R  F  F  S  P  S  E  H  H

385 GAT CTC ATG GAA AAG GAC GAC TCA GAG CGC CTG TCG TAT TTC TAT CAT
      D  L  M  E  K  D  D  S  E  R  L  S  Y  F  Y  H

433 TTG TGG ACG ATG AAA GAA AGC TTT ATC AAA CAG GCG GGA AAA GGC CTG
      L  W  T  M  K  E  S  F  I  K  Q  A  G  K  G  L

481 TCT CTG CCG CTT GAT TCT TCT CCG TCA AAC TGC AAC GAA CAG GAC GCG
      S  L  P  L  D  S  S  P  S  N  C  N  E  Q  D  A

```

```

529  CTT CGG TGG ACA CTC CCC CAG GCA TAT CCG CCT TGC TAT ATC CAA GCC
      L  R  W  T  L  P  Q  A  Y  P  P  C  Y  I  Q  A

577  TAT GAA ATT GAC CCA GGC TAT AAA ATG GCG GTG TGT TCC GCC GCA CCT
      Y  E  I  D  P  G  Y  K  M  A  V  C  S  A  A  P

625  GAA TTT CCA GAC CGC ATT GTG ATG AAA ACG TGC GCT GAA CTG TCA ACG
      E  F  P  D  R  I  V  M  K  T  C  A  E  L  S  T

673  CTT TAA AAA GTT CCG CTC TAA AAA
      L  -

```

DNA-Sequenz von bli aus *B. licheniformis* ATCC 10716 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.
Die zur PCR-Amplifikation verwendeten Primer sind durch fette Buchstaben hervorgehoben.

```

1   GCA TGC AGA TTT ACG CCG TTT ATA TGG ATC GCC CGG AAG CCG GCC AAT
      M  Q  I  Y  A  V  Y  M  D  R  P  E  A  G  Q

49  TTA ACC GAA TGA TGG CCA TGG TCT CTG AAG AAA AGC GCA AAA AAG TGG
      F  N  R  M  M  A  M  V  S  E  E  K  R  K  K  V

97  GCA GAT ACA GAT ATC CCG AAG ATG CCA GCA GGA CGC TGA TCG GGG AAG
      G  R  Y  R  Y  P  E  D  A  S  R  T  L  I  G  E

145 TGC TGG CGA GGC ACA TCA TCA GTG AAA CGT TTC ATT TAC CGA ACG ATC
      V  L  A  R  H  I  I  S  E  T  F  H  L  P  N  D

193 AGA TCC GTT TTA CGG AAG GAA GGT ACG GCA AAC CGG CTG CTG AAG GTC
      Q  I  R  F  T  E  G  R  Y  G  K  P  A  A  E  G

241 TGA ACG ACT TTC ATT TCA ACA TTT CCC ACT CCG GAA ACT GGA TCG TGT
      L  N  D  F  H  F  N  I  S  H  S  G  N  W  I  V

289 GCG GAG CTG GCA CCA AGC CGA TCG GAG TGG ATG TCG AAA AAA TCA AGC
      C  G  A  G  T  K  P  I  G  V  D  V  E  K  I  K

337 CGA TCA ATT TCG ACA TTG CCG AGC GGT TTT TTT CTC CTT CAG AGC ACC
      P  I  N  F  D  I  A  E  R  F  F  S  P  S  E  H

385 ATG ATC TCA TGG AAA AGG ACG ACT CAG AGC GCC TGT CGT ATT TCT ATC
      H  D  L  M  E  K  D  D  S  E  R  L  S  Y  F  Y

433 ATT TGT GGA CGA TGA AAG AAA GCT TTA TCA AAC AGG CGG GAA AAG GCC
      H  L  W  T  M  K  E  S  F  I  K  Q  A  G  K  G

481 TGT CTC TGC CGC TTG ATT CCT TCT CCG TCA AAC TGA ACG AAC AAG GAC
      L  S  L  P  L  D  S  F  S  V  K  L  N  E  Q  G

529 GCG CTT CGG TGG AAA CTC CCC CAG GCT ATC CGC CTT GCT ATA TCC AAG
      R  A  S  V  E  T  P  P  G  Y  P  P  C  Y  I  Q

577 CCT ATG AAA TTG ACC CAG GCT ATA AAA TGG CGG TGT GTT CCG CCG CAC
      A  Y  E  I  D  P  G  Y  K  M  A  V  C  S  A  A

625 CTG AAT TTC CAG ACC GCA TTG TGA TGA AAA GCT GCG CTG AAC TGT CAA
      P  E  F  P  D  R  I  V  M  K  S  C  A  E  L  S

673 CGC TTG GAT CC
      T  L  G  S

```

8 Literaturverzeichnis

- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Farrell, D.H. und Crosa, J.H. (1988) Genetic and molecular characterization of essential components of the *Vibrio anguillarum* plasmid-mediated iron-transport system. *J. Biol. Chem.* **263**: 2853-2860.
- Adams, C., Dowling, D.N., DJ, O.S. und F, O.G. (1994) Isolation of a gene (*pbsC*) required for siderophore biosynthesis in fluorescent *Pseudomonas* sp. strain M114. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 515-524.
- Albertini, A.M., Caramori, T., Scoffone, F., Scotti, C. und Galizzi, A. (1995) Sequence around the 159 degree region of the *Bacillus subtilis* genome: the *pksX* locus spans 33.6 kb. *Microbiology* **141**: 299-309.
- Allgeier, H.G., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U. und Zähler, H. (1985) Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic. *Angew. Chem.* **24**: 1051-1053.
- Anand, R. (1988) Pulsed-field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet.* **2**: 278-283.
- Aparicio, J.F., Molnar, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., et al. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* **169**: 9-16.
- Arima, K., Kakinuma, A. und Tamura, G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**: 488-494.
- Aronson, D.B. und Boyer, G.L. (1994) Growth and siderophore formation in six iron-limited strains of *Frankia*. *Soil. Biol. Biochem.* **265**: 561-567.
- Bailey, A.M., Kershaw, M.J., Hunt, B.A., Paterson, I.C., Charnley, A.K., Reynolds, S.E. und Clarkson, J.M. (1996) Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **173**: 195-197.
- Baldwin, T.O. (1996) Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure* **4**: 223-228.
- Bearden, S.W., Fetherston, J.D. und Perry, R.D. (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **65**: 1659-1668.
- Bernhard, F. (1998) Identification of genes encoding for peptide synthetases from Gram-negative bacteria and filamentous fungi. *unpublished*.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G. und Delcambe, L. (1977) [The structure of bacillomycin L, an antibiotic from *Bacillus subtilis* (author's transl.)]. *Eur. J. Biochem.* **77**: 61-67.
- Billich, A. und Zocher, R. (1987) Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **262**: 17258-17259.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blattner, F.R., Burland, V., Plunkett, G.d., Sofia, H.J. und Daniels, D.L. (1993) Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5408-5417.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heynecke, H.L., Boyer, H.W., et al. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., et al. (1995) .Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* **55**: 2325-2333.
- Borchert, S., Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (1994) Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **176**: 2458-2462.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Brooks, J.E., Nathan, P.D., Landry, D., Sznyter, L.A., Waite-Rees, P., Ives, C.L., et al. (1991) Characterization of the cloned *Bam*HI restriction modification system: its nucleotide sequence, properties of the methylase, and expression in heterologous hosts. *Nucleic Acids Res.* **19**: 841-850.
- Brunner, R. (1965). Polypeptide. In *Die Antibiotica* (ed. R. Brunner und G. Machek), pp. 167-214. Verlag Carl, Nürnberg, Germany.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I. und Häuptle, M.T.D., B. (1987) A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **155**: 416-433.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta- galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Cantor, C.R., Smith, C.L. und Methew, M.K. (1988) Pulsed-field gel electrophoresis of very large molecules. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**: 287-304.
- Cardinale, G.J. und Abeles, R.H. (1968) Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry* **7**: 3970-3978.
- Chambers, C.E., McIntyre, D.D., Mouck, M. und Sokol, P.A. (1996) Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Biometals* **9**: 157-167.
- Chen, C.L., Chang, L.K., Chang, Y.S., Liu, S.T. und Tschén, J.S. (1995) Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 121-125.
- Cheret, G., Pallier, C., Valens, M., Diagnan-Fornier, B., Fukuhara, H., Bolotin-Fukuhara, M. und Sor, F. (1993) The DNA sequence analysis of the HAP4-LAP4 region on chromosome XI of *Saccharomyces cerevisiae* suggests the presence of a second aspartate aminotransferase gene in yeast. *Yeast* **9**: 1259-1265.
- Clark, L. und Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic ColE1 Hybrid Plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-99.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Conti, E., Franks, N.P. und Brick, P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. und Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16**: 4174-4183.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B. und Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 408-412.
- Cornish-Bowden, A. (1995). Reaction of more than one substrate. In *Fundamentals of enzyme kinetics*, pp. 129-159. Portland Press Ltd., London.
- Cortes, J., Wiesmann, K.E., Roberts, G.A., Brown, M.J., Staunton, J. und Leadlay, P.F. (1995) Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268**: 1487-1489.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. und van Sinderen, D. (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8**: 821-831.
- Cox, C.D. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promotor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**.
- Cusack, S., Yaremchuk, A. und Tukalo, M. (1996) The crystal structures of *T. thermophilus* lysyl-tRNA synthetase complexed with *E. coli* tRNA(Lys) and a *T. thermophilus* tRNA(Lys) transcript: anticodon recognition and conformational changes upon binding of a lysyl-adenylate analogue. *EMBO J.* **15**: 6321-6234.
- Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.

- Dax, S.L.** (1997) *Antibacterial chemotherapeutic agents*, 1 edition. Chapman & Hall, Padstow, Great Britain.
- de Crecy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., et al.** (1997a) Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J. Bacteriol.* **179**: 705-713.
- De Crecy-Lagard, V., Marliere, P. und Saurin, W.** (1995) Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C. R. Acad. Sci. III* **318**: 927-936.
- de Crecy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. und Blanc, V.** (1997b) Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1904-1909.
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. und Grandi, G.** (1997) Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.* **272**: 25304-25309.
- Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q., Stewart, K., Lambalot, R.H. und Neuhaus, F.C.** (1996) The D-alanyl-carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of the *dltC* gene. *J. Bacteriol.* **178**: 3869-3876.
- Delarue, M.** (1995) Partition of aminoacyl-tRNA synthetases in two different structural classes dating back to early metabolism: implications for the origin of the genetic code and the nature of protein sequences. *J. Mol. Evol.* **41**: 703-711.
- Desai, J.D. und Banat, I.M.** (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H. und Kleinkauf, H.** (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **357**: 212-216.
- Dittmann, E., Neilan, B.A., Erhard, M., von Döhren, H. und Börner, T.** (1997) Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 [In Process Citation]. *Mol. Microbiol.* **26**: 779-787.
- Dökel, S. und Marahiel, M.A.** (1997) Unpublished results. .
- Dorr, R.T.** (1992) Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin. Oncol.* **19**: 3-8.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127.
- Dubnau, D.** (1989). The competence regulon of *Bacillus subtilis*. In *Regulation of procaryotic development*, pp. 147-166. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Ebata, M., Miyazaki, K. und Takahashi, Y.** (1969) Studies on subsporin. I. Isolation and characterization of subsporins A, B and C. *J. Antibiot. (Tokyo)* **22**: 467-472.
- Entian, K.-D. und Klein, C.** (1993) Lantibiotika, eine Klasse ribosomal synthetisierter Peptid-Antibiotika. *Naturwissenschaften* **80**: 454-460.
- Farabough, P.J.** (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**: 765-769.
- Faraci, W.S. und Walsh, C.T.** (1988) Racemization of alanine by the alanine racemases from *Salmonella typhimurium* and *Bacillus stearothermophilus*: energetic reaction profiles. *Biochemistry* **27**: 3267-3276.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., Andre, B., Baclet, M.C., Barthe, C., et al.** (1994) Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBOJ.* **13**: 5795-5809.
- Fernandez-Moreno, M.A., Martinez, E., Boto, L., Hopwood, D.A. und Malpartida, F.** (1992) Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J. Biol. Chem.* **267**: 19278-19290.
- Fiechter, A.** (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *TIBTECH* **10**: 208-217.

- Ford, R.A. und Bhattacharjee, J.K.** (1995) Molecular properties of the *lysI* + gene and the regulation of alpha-aminoadipate reductase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **28**: 131-137.
- Frøyshov, Ø.** (1974) Bacitracin biosynthesis by three complementary fractions from *Bacillus licheniformis*. *FEBS Lett.* **44**: 75-78.
- Frøyshov, Ø.** (1984). The bacitracins : Properties, biosynthesis, and fermentation. In *Biochemistry of industrial antibiotics* (ed. E.J. Vandamme). Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Frøyshov, Ø. und Laland, S.G.** (1974) On the biosynthesis of bacitracin by a soluble enzyme complex from *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* **46**: 235-242.
- Frøyshov, Ø., Zimmer, T.L. und Laland, S.G.** (1970) The nature of the enzyme-bound intermediates in gramicidine S biosynthesis. *FEBS Lett.* **7**: 68-71.
- Fujikawa, K., Sakamoto, Y., Suzuki, T. und Kurahashi, K.** (1968) Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. II. Amino acid substitution in tyrocidine. *Biochim. Biophys. Acta* **169**: 520-533.
- Gaidenko, T.A. und Khaikinson, M.** (1988) Cloning of the genes controlling the biosynthesis of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **2**: 24-28.
- Galakatos, N.G. und Walsh, C.T.** (1987) Specific proteolysis of native alanine racemases from *Salmonella typhimurium*: identification of the cleavage site and characterization of the clipped two-domain proteins. *Biochemistry* **26**: 8475-8480.
- Gallo, K.A., Tanner, M.E. und Knowles, J.R.** (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**: 3991-3997.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. und Walsh, C.T.** (1998) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of Yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **submitted**.
- Gentil, G., Yuan, M.W., Budde, A.D., von Döhren, H. und Leong, S.A.** (1997) Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene encoding a multidomain peptide synthetase involved in ferrichrome biosynthesis: Linkage to *sid1*, the first gene in the ferrichrome biosynthetic pathway. *unpublished*.
- Gevers, W., Kleinkauf, H. und Lipmann, F.** (1968) The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**: 269-276.
- Gevers, W., Kleinkauf, H. und Lipmann, F.** (1969) Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 1335-1342.
- Gill, S.C. und vonHippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- Gish, W. und States, D.J.** (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**: 266-272.
- Gocht, M. und Marahiel, M.A.** (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **176**: 2654-2662.
- Gammel, N., Schwartz, D., Wohleben, W. und Keller, U.** (1998) Phosphinotricin-tripeptide Synthetase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochemistry* **37**: 1596-1603.
- Griffith, G.L., Siegel, S.P., Payne, S.M. und Neilands, J.B.** (1984) Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* **259**: 383-385.
- Grodberg, J. und Dunn, J.J.** (1988) *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245-1253.
- Gross, E. und Morell, J.L.** (1971) The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 4634-4635.
- Grossman, T.H., Tuckman, M., Ellestad, S. und Osburne, M.S.** (1993) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* genes involved in siderophore biosynthesis: relationship between *B. subtilis* *sfpo* and *Escherichia coli* *entD* genes. *J. Bacteriol.* **175**: 6203-6211.
- Guilvout, I., Mercereau-Paujalon, O., Bonnefoy, S., Pugsley, A.P. und Carniel, E.** (1993) High-Molecular-Weight Protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins in nonribosomal peptide synthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 5488-5504.

- Gutierrez, S., Diez, B., Montenegro, E. und Martin, J.F. (1991) Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding alpha-aminoacyl-tRNA synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.* **173**: 2354-2365.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G. und Zahner, H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2159-2165.
- Haese, A., Pieper, R., von Ostrowski, T. und Zocher, R. (1994) Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *J. Mol. Biol.* **243**: 116-122.
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. und Zocher, R. (1993) Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing *N*-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **7**: 905-914.
- Hamaguchi, K. und Geiduschek, E.P. (1962) The effect of electrolytes on the stability of desoxyribonucleate helix. *J. Am. Chem. Soc.* **84**: 1329-1337.
- Hanes, P.M. (1932) *Biochem. J.* **26**: 1406-1421.
- Heaton, M.P. und Neuhaus, F.C. (1992) Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D- alanine-activating enzyme. *J. Bacteriol.* **174**: 4707-4717.
- Heesemann, J. (1987) Chromosomal encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**: 229-233.
- Heesemann, J., Hantke, K., Vocke, T., Saken, E., Rakin, A., Stojiljkovic, I. und Berner, R. (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.* **8**: 397-408.
- Hickey, R.J. (1964) Bacitracin, its manufacture and uses. *Prog. Ind. Microbiol.* **5**: 93-150.
- Hoch, J.A. und Mathews, J. (1973) Chromosomal location of pleiotropic sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **73**: 215-228.
- Hochuli, E. (1989) Aufarbeitung von Bioproteinen: Elegant und wirtschaftlich. *Chemische Industrie* **12**: 69-70.
- Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Horowitz, S., Gilbert, J.N. und Griffin, W.M. (1990) Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *J. Ind. Microbiol.* **6**: 243-248.
- Horowitz, S. und Griffin, W.M. (1991) Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. *J. Ind. Microbiol.* **7**: 45-52.
- Hosted, T.J. und Baltz, R.H. (1998) *Streptomyces fradiae* peptide synthetase module (*cps-I*) gene. *unpublished*.
- Ishihara, H., Hara, N. und Iwabuchi, T. (1989) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus licheniformis* bacitracin synthetase 2 gene. *J. Bacteriol.* **171**: 1705-1711.
- Ishihara, H., Sasaki, T. und Shimura, K. (1968) Biosynthesis of bacitracin. II. Incorporation of ¹⁴C-labeled amino acids into bacitracin by a cell-free preparation from *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **166**: 496-504.
- Ishihara, H. und Shimura, K. (1974) Biosynthesis of bacitracin. III. Partial purification of a bacitracin-synthesizing enzyme system from *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta* **338**: 588-600.
- Ishihara, H. und Shimura, K. (1979) Thiazoline ring formation in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett.* **99**: 109-112.
- Ishihara, H. und Shimura, K. (1988) Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett* **226**: 319-323.
- Jalal, M.A.F., Hossian, M.B., van der Helm, D., Sanders-Loehr, J., Actis, L.A. und Crosa, J.H. (1989) Structure of anguibactin, a unique plasmid-related bacterial siderophore from the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 292-296.

- Jenneman, G.E., McInerney, M.J., Knapp, R.M., Clark, J.B., Ferro, J.M., Revus, D.E. und Menzie, D.E. (1983) A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**: 485-492.
- Jenny, K., Käppeli, O. und Fiechter, A. (1991) Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 5-13.
- Jerpseth, B., Greener, A., Short, J.M., Viola, J. und Kretz, P.-L. (1993) *Strategies* **5**: 2-3.
- Johnson, B.A., Anker, H. und Meleney, F.L. (1945) Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**: 376-377.
- Jung, G. (1991) Lantibiotika - ribosomal synthetisierte Polypeptidwirkstoffe mit Sulfidbrücken und alpha,beta-Didehydroaminoaciden. *Angew. Chem.* **103**: 1067-1084.
- Keller, U. (1987) Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin. *J. Biol. Chem.* **262**: 5852-5856.
- Kennedy, J. und Turner, G. (1996) delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 189-197.
- Kim, H.S., Choi, E.C. und Kim, B.K. (1993) A macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus anthracis* 590: cloning and expression of *ermJ*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 601-607.
- Kimura, H., Miyashita, H. und Sumino, Y. (1996) Organization and expression in *Pseudomonas putida* of the gene cluster involved in cephalosporin biosynthesis from *Lysobacter lactamgenus* YK90. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 490-501.
- Kittelberger, R., Altmann, M. und von Döhren, H. (1982). Kinetics of Amino Acid Activation in Gramicidin S Synthesis. In *Peptide Antibiotics, Biosynthesis and Functions* (ed. H. Kleinkauf und H. von Döhren), pp. 209-218. Walter de Gruyter, Berlin.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. und Entian, K.-D. (1992) Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 132-142.
- Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1990a) Bioactive peptide analogs: *in vivo* and *in vitro* production. *Prog. Drug Res.* **34**: 287-317.
- Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1990b) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**: 1-15.
- Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**: 335-351.
- Konz, D., Doekel, S. und Marahiel, M.A. (1998) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling the biosynthesis of the lipopeptide lichenysin of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* submitted.
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. und Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.* **4**: 927-937.
- Krätzschmar, J., Krause, M. und Marahiel, M.A. (1989) Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**: 5422-5429.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kurahashi, K. (1974) Biosynthesis of small peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **43**: 445-459.
- Laland, S.G. und Zimmer, T.L. (1973) The protein thiotemplate mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by *Bacillus brevis*. *Essays Biochem.* **9**: 31-57.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., et al. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**: 923-936.
- Lambalot, R.H. und Walsh, C.T. (1995) Cloning, overproduction, and characterization of the *E. coli* holo-acyl carrier protein synthetase. *J. Bacteriol.* **270**: 24658-24661.
- Lee, S.G., Littau, V. und Lipmann, F. (1975) The relation between sporulation and the induction of antibiotic synthesis and of amino acid uptake in *Bacillus brevis*. *J. Cell. Biol.* **66**: 233-242.

- Leslie, A.G.W.** (1990) Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at a 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **213**: 167-186.
- Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. und Walsh, C.T.** (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**: 1188-1193.
- Lim, H.M. und Pene, J.J.** (1988) Optimal conditions for supercoil DNA-sequencing with *E. coli* DNA polymerase I large fragment. *Gene Anal. Techniques* **5**: 32-39.
- Lin, S.C., Minton, M.A., Sharma, M.M. und Georgiou, G.** (1994) Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 31-38.
- Lipmann, F.** (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. *Adv. Microb. Physiol.* **21**: 227-266.
- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H. und Roskoski, R., Jr.** (1971) Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **35**: 1-34.
- MacCabe, A.P., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles, S.E., Riach, M.B., Pfeifer, E., et al.** (1991) Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **266**: 12646-12654.
- Makinen, K.K.** (1972) Inhibition of bacitracin of some hydrolytic enzymes. *Int. J. Pept. Protein Res.* **4**: 21-28.
- Maniatis, T., Jeffery, A. und v.d. Sande, H.** (1975) Chain length determination of small double- and single-stranded DNA by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **14**: 3787-3794.
- Marahiel, M.A.** (1997) Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **4**: 561-567.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. und Mootz, H.D.** (1997) Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2651-2673.
- Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K.H., Westphal, A.H., de Kok, A. und Hol, W.G.J.** (1992) Atomic structure of cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* **255**.
- McHenney, M.A., Hosted, T.J., Dehoff, B.S., Rosteck, P.R., Jr. und Baltz, R.H.** (1998) Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *J. Bacteriol.* **180**: 143-151.
- McInerney, M.J., Javaheri, M. und Nagle, D.P., Jr.** (1990) Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 95-101.
- Mei, B., Budde, A.D. und Leong, S.A.** (1993) *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 903-907.
- Meissner, K., Dittmann, E. und Borner, T.** (1996) Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 295-303.
- Merriman, T.R., Merriman, M.E. und Lamont, I.L.** (1995) Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. *J. Bacteriol.* **177**: 252-258.
- Mhammedi, A., Peypoux, F., Besson, F. und Michel, G.** (1982) Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group: isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **35**: 306-311.
- Mootz, H.D. und Marahiel, M.A.** (1997a) Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 543-551.
- Mootz, H.D. und Marahiel, M.A.** (1997b) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**: 6843-6850.
- Morris, M.** (1994) Primary structural confirmation of components of the bacitracin complex. *Biol. Mass Spec.* **23**: 61-70.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.

- Naegeli, H. und Zähler, H.** (1980) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. *Helv. Chim. Acta* **63**: 1400-1406.
- Nakano, M.M., Marahiel, M.A. und Zuber, P.** (1988) Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5662-5668.
- Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T. und Umezawa, H.** (1986) Plipastatins: New inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-ff67. III. Structural elucidations of plipastatins. *J. Antibiot.* **39**: 755-761.
- Nishio, C., Komura, S. und Kurahashi, K.** (1983) Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**: 751-758.
- Okujo, N., Saito, M., Yamamoto, S., Yoshida, T., Miyoshi, S. und Shinoda, S.** (1994) Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biometals* **7**: 109-116.
- Onesti, S., Miller, A.D. und Brick, P.** (1995) The crystal structure of the lysyl-tRNA synthetase (LysU) from *Escherichia coli*. *Structure* **3**: 163-176.
- Ong, S.A., Peterson, T. und Neilands, J.B.** (1979) Agrobactin, a siderophore from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.* **254**: 1860-1865.
- Oudega, B., Vandenbol, M. und Koningstein, G.** (1997) A 12 kb nucleotide sequence containing the alanine dehydrogenase gene at 279 degrees on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology* **143**: 1489-1491.
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., Schroder, W., von Dohren, H. und Kleinkauf, H.** (1994) Identification of the ATP binding site in tyrocidine synthetase 1 by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanate. *J. Biol. Chem.* **269**: 14962-14966.
- Pazirandeh, M., Chirala, S.S., Huang, W.Y. und Wakil, S.J.** (1989) Characterization of recombinant thioesterase and acyl carrier protein domains of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 18195-18201.
- Pazirandeh, M., Chirala, S.S. und Wakil, S.J.** (1991) Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 20946-20952.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C., Schubert, S. und Heesemann, J.** (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **180**: 538-546.
- Pelzer, S., Reichert, W., Huppert, M., Heckmann, D. und Wohlleben, W.** (1997) Cloning and analysis of a peptide synthetase gene of the balhimycin producer *Amiclatopsis mediterranei* DSM5908 and development of a gene disruption/replacement system. *J. Biotechnol.* **56**: 115-128.
- Peterson, T. und Neilands, J.B.** (1979) Revised structure of a catecholamide spermidine siderophore from *Paracoccus denitrificans*. *Tetrahedron Lett.* **50**: 4805-4808.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G. und Delcambe, L.** (1981) Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *Eur. J. Biochem.* **118**: 323-327.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L. und Delcambe, L.** (1980) Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. *J. Antibiot. (Tokyo)* **33**: 1146-1149.
- Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Declambe, L., Das, C. und Lederer, E.** (1978) Structure of iturin A, a peptidelipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **17**: 3992-3996.
- Pfaender, P.** (1972) [Biosynthesis of bacitracin]. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig A]* **220**: 319-321.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeyer, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., et al.** (1996) An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3132-3137.
- Pieper, R., Haese, A., Schroder, W. und Zocher, R.** (1995) Arrangement of catalytic sites in the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *Eur. J. Biochem.* **230**: 119-126.
- Podlesek, Z. und Grabnar, M.** (1987) Genetic mapping of the bacitracin synthetase gene(s) in *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3093-3097.
- Porath, J., Carlson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.

Pseudomonas-genome-project (1998) <http://www.pseudomonas.com.html>.

- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. und Walsh, C.T. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**: 1585-1595.
- Quentin, M.J., Besson, F., Peypoux, F. und Michel, G. (1982) Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **684**: 207-211.
- Ratledge, C. und Ewing, M. (1996) The occurrence of carboxymycobactin, the siderophore of pathogenic mycobacteria, as a second extracellular siderophore in *Mycobacterium segmatis*. *Microbiology* **142**: 2207-2212.
- Rawlings, M. und Cronan, J.E., Jr. (1992) The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J. Biol. Chem.* **267**: 5751-5754.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. und Hopwood, D.A. (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.
- Rieber, M.T., Imaeda, T. und Cesari, I.M. (1969) Bacitracin action on membranes of *Mycobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* **55**: 155-159.
- Rowland, B.M., Grossman, T.H., Osburne, M.S. und Taber, H.W. (1996) Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. *Gene* **178**: 119-123.
- Rusnak, F., Faraci, W.S. und Walsh, C.T. (1989) Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product. *Biochemistry* **28**: 6827-6835.
- Rusnak, F., Sakaitani, M., Drueckhammer, D., Reichert, J. und Walsh, C.T. (1991) Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **30**: 2916-2927.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of cell anemia. *Science* **230**: 1350.
- Saito, M., Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M. und Saito, Y. (1995) Three conserved glycine residues in valine activation of gramicidin S synthetase 2 from *Bacillus brevis*. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**: 276-282.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F. und Coulson, A.R. (1978) The use of thin acrylamid gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.* **87**: 107-110.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Schroeder, W. und Keller, U. (1998) Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. *J. Bacteriol.* **180**: 2468-2474.
- Schechter, N., Momose, K. und Rudney, H. (1972) The effect of bacitracin and Ca⁺⁺ on the formation of polyprenylphosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**: 833-839.
- Schleifer, K.H., Kloos, W.E. und Moore, A. (1972) Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872: correlation between peptidoglycan type and genetic compatibility. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 224-227.
- Schlumbohm, W., Vater, J. und Kleinkauf, H. (1985) Reactive sulfhydryl groups involved in the aminoacyl adenylate activation reactions of the gramicidin S synthetase 2. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **366**: 925-930.
- Schneider, A. und Marahiel, M.A. (1998a) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* **169**: 404-410.
- Schneider, A., Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (1998b) Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping [In Process Citation]. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 308-318.

- Schwartz, D., Alijah, R., Nussbaumer, B., Pelzer, S. und Wohlleben, W. (1996) The peptide synthetase gene *phsA* from *Streptomyces viridochromogenes* is not juxtaposed with other genes involved in nonribosomal biosynthesis of peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 570-577.
- Schwartz, E., Scherrer, G., Hobom, G. und Kössel, H. (1987) Nucleotide sequence of *cro*, *cII* and part of the *O* gene in phage lambda DNA. *Nature* **272**: 410-414.
- Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Dohren, H., Kleinkauf, H. und van Liempt, H. (1992) Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha- aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Eur. J. Biochem.* **205**: 687-694.
- Scogin, D.A., Mosberg, H.I., Storm, D.R. und Gennis, R.B. (1980) Binding of nickel and zinc ions to bacitracin A. *Biochemistry* **19**: 3348-3352.
- Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Pocard, J.A. und Walton, J.D. (1992) The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. *J. Biol. Chem.* **267**: 26044-26049.
- Scotti, C., Piatti, M., Cuzzoni, A., Perani, P., Tognoni, A., Grandi, G., et al. (1993) A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* **130**: 65-71.
- Scutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Meth. Enzymol.* **43**: 77-90.
- Segel, I.H. (1975). Rapid equilibrium bireactant and tertrareactant systems. In *Enzyme kinetics*, pp. 273-283. Wiley-Interscience.
- Selva, E., Montanini, N., Stella, S., Soffientini, A., Gastaldo, L. und Denaro, M. (1997) Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)* **50**: 22-26.
- Serino, L., Reimmann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V.D. und Haas, D. (1997) Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron- regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 248-257.
- Sharp, P.A., Sudgen, B. und Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae*. *Biochemistry* **12**: 3055.
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M.J., Kieser, H.M., Bibb, M.J. und Hopwood, D.A. (1989) Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. *EMBO J.* **8**: 2717-2125.
- Shiau, C.Y., Baldwin, J.E., Byford, M.F. und Schofield, C.J. (1995) Delta-L-(alpha-aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase: isolation of L-cysteinyl-D-valine, a 'shunt' product, and implications for the order of peptide bond formation. *FEBS Lett.* **373**: 303-306.
- Smith, D.J., Earl, A.J. und Turner, G. (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *EMBO J.* **9**: 2743-2750.
- Snow, G.A. (1970) Mycobactins: iron chelating growth factors from Mycobacteria. *Microbiol. Rev.* **34**: 99-125.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spatafora, G., Rohrer, K., Barnard, D. und Michalek, S. (1995) A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic *in vivo*. *Infect. Immun.* **63**: 2556-2563.
- Stachelhaus, T., Hüser, A. und Marahiel, M.A. (1996a) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**: 913-921.
- Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (1995a) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* **270**: 6163-6169.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. und Marahiel, M.A. (1998) peptide-bond formation in non-ribosomal peptide biosynthesis: Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **in press**.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. und Marahiel, M.A. (1995b) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269**: 69-72.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. und Marahiel, M.A. (1996b) Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 177-186.

- Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A. und Wittmann-Liebold, B. (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4' - phosphopantetheine. *Biochemistry* **34**: 4633-4642.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., et al. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271**: 15428-15435.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., et al. (1994) Detection of 4' - phosphopantetheine at the thioester binding site for L- valine of gramicidinS synthetase 2. *FEBS Lett.* **340**: 39-44.
- Stindl, A. und Keller, U. (1994) Epimerization of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D. *Biochemistry* **33**: 9358-9364.
- Stone, K.J. und Strominger, J.L. (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ions and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 3223-3227.
- Storm, D.R. und Strominger, J.L. (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. *J. Biol. Chem.* **248**: 3940-3945.
- Strohl, W.R. (1997) Biotechnology of antibiotics. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990). System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In *Immunological Methods* (ed. I. Levkovits und B. Pernis), pp. 121-152.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Stuhlberg, M.P. und Novelli, G.D. (1960) Amino acid-activating enzymes: methods of assay. *Methods Enzymol.* **5**: 703-707.
- Suvarna, K.C. und Bhattacharjee, J.K. (1998) Molecular analysis of the LYS2 gene and the regulation of alpha-aminoadipate reductase in *Candida albicans*. *unpublished*.
- Taketo, A. (1988) DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* **949**: 318.
- Thomas, D.W. und Ito, T. (1969) The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron* **25**: 1985-1990.
- Tognoni, A., Franchi, E., Magistrelli, C., Colombo, E., Cosmina, P. und Grandi, G. (1995) A putative new peptide synthase operon in *Bacillus subtilis*: partial characterization. *Microbiology* **141**: 645-648.
- Tokita, K., Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M. und Saito, Y. (1993) Effect of single base substitutions at glycine-870 codon of gramicidin S synthetase 2 gene on proline activation. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**: 522-527.
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A. und Crosa, J.H. (1988) Genetic analysis of the iron uptake region of the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1: molecular cloning of genetic determinants encoding a novel trans activator of siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.* **170**: 1913-1919.
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A. und Crosa, J.H. (1993) A single amino acid change in AngR, a protein encoded by pJM1-like virulence plasmids, results in hyperproduction of anguibactin. *Infect. Immun.* **61**: 3228-3233.
- Tomino, S. und Kurahashi, K. (1964) Enzymic synthesis of D-phenylalanyl-L-prolyl-L-valine, a peptide sequence present in gramicidin S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**: 288-293.
- Turgay, K., Krause, M. und Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**: 529-546.
- Turgay, K. und Marahiel, M.A. (1994) A general approach for identifying and cloning peptide synthetase genes. *Pept. Res.* **7**: 238-241.
- Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z. und Vater, J. (1991) Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **30**: 6503-6508.
- Ullrich, M. und Bender, C.L. (1994) The biosynthetic gene cluster for coronamic acid, an ethylcyclopropyl amino acid, contains genes homologous to amino acid-activating enzymes and thioesterases. *J. Bacteriol.* **176**: 7574-7586.

- van Wageningen, A., Kirkpatrick, P., Williams, D., Harris, B., Kershaw, J., Lennard, N., et al. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *unpublished*.
- Vanittanakom, N. und Loeffler, W. (1986) Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibiot.* **39**: 888-901.
- Vater, J. und Kleinkauf, H. (1976) Gramicidin S-synthetase. A further characterization of phenylalanine racemase, the light enzyme of gramicidin S-synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* **429**: 1062-1072.
- Vater, J., Mallow, N., Gerhardt, S., Gadow, A. und Kleinkauf, H. (1985) Gramicidin S synthetase. Temperature dependence and thermodynamic parameters of substrate amino acid activation reactions. *Biochemistry* **24**: 2022-2027.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982) The pUC plasmids an M13mp7-derived systems for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers. *Gene* **19**: 159-268.
- Vinnig, L.C. und Stuttard, C. (1995) Genetics an biocemistry of antibiotic production. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, USA.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preperative and analytcal purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- von Döhren, H. und Kleinkauf, H. (1997) Products of secondary metabolism. In *Biotechnology*, vol. 7 (ed. H.-J. Rehm und G. Reed). VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Walton, J.R. (1981) Modes of action of growth promoting agents. *Fortschr. Veterinaarmed.* **33**: 77-82.
- Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. und Leitner, E. (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26**: 120-125.
- Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Walsh, C.T. und Zuber, P. (1998) Stoichiometry and specificity of *in vitro* phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry* **37**: 1575-1584.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., et al. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* **368**: 32-38.
- Yahimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. und Fredrickson, H.L. (1995) Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1706- 1713.
- Yakimov, M.M., Fredrickson, H.L. und Timmis, K.N. (1996) Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**: 13-18.
- Yakimov, M.M., Kroeger, A., Slepak, T.N., Jaerke, D., Timmis, K.N. und Golyshin, P.N. (1998) A putative lichenysin A synthetase operon in *B.licheniformis*: initial characterization. *unpublished*.
- Yamamoto, S., Okuio, N., Fujita, Y., Saito, M., T., Y. und Shinoda, S. (1993) Structure of two polyamine-containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*. *J. Biochem.* **113**: 538-544.
- Yamamoto, S., Okujo, N. und Sakakibara, Y. (1994) Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch. Microbiol.* **162**: 249-254.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences of M13mp18 and pUC 19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yorgey, P., Davagnino, J. und Kolter, R. (1993) The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**: 897-905.
- Zamenhof, P.J. und Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**: 171-178.
- Zhang, Z., Schofield, C.J., Baldwin, J.E., Thomas, P. und John, P. (1995) Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochem J* **307**: 77-85.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. A. Marahiel danke ich für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung der Arbeit sowie zahlreiche anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Kindl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. C. T. Walsh und seiner gesamten Arbeitsgruppe sowie insbesondere Dr. P. H. Weinreb danke ich für die interessante und angenehme Zusammenarbeit während meines Aufenthalts an der Harvard Medical School, Boston, USA.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt den PPS-Kollegen Dr. Torsten Stachelhaus, Henning Mootz und Sascha Dökel.

Für technische Hilfen möchte ich mich bei Gabi Schimpff-Weiland und vor allem bei Inge Schüler bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Katja Peter, Dr. Axel Schneider, Thomas Grott, Petra Ziegler, Andrea Klens, Daniel Winkelmann und zum Schluß Heiner Kößler für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Labor 4716.

Andrea Klens und Thomas Wendrich danke ich sehr für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Für die finanzielle Unterstützung der durchgeführten Untersuchungen danke ich der Biochemie GmbH, Kundl, Österreich.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern sowie natürlich insbesondere bei Stephanie Schmidt bedanken, die durch ihre liebevolle Unterstützung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.